Aus der WE Anatomie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Morphometrische Analyse des Skeletts von Rattenfoeten sowie elektronenmikroskopische Befunde nach Einwirkung der potentiellen Teratogene Azathioprin und Cyclophosphamid

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Asisullah Asisi

aus Kabul/Afghanistan

1976

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547205_0085

Aus der WE Anatomie der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Willy Schwarz

Morphometrische Analyse des Skeletts von Rattenfoeten sowie elektronenmikroskopische Befunde nach Einwirkung der potentiellen Teratogene Azathioprin und Cyclophosphamid

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Asisullah Asisi

aus Kabul/Afghanistan

1. Referent: Prof. Dr. med. H.-J. MERKER

2. Referent: Prof. Dr. Willy Schwarz

Tag der Promotion: 28.6.76

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Herrn Prof. Dr. H.-J.Merker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die Anregung zur Arbeit, Diskussion und nicht zuletzt Beschaffung des Materials danke ich Herrn Prof. Dr. Milan Pospisil.

Mein Dank für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gilt ebenfalls Herrn Dr. Richard Roetz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung
2	Material und Methoden
3	Ergebnisse
3.1	Morphometrische Daten des foetalen Skeletts
3.1.1	nach Azathioprin
3.1.2	nach Cyclophosphamid
3.1.3	nach Azathioprin und Cyclophosphamid
3.2	Beschreibung der Mißbildungen
3.3	Histologische Befunde
3.4	Elektronenmikroskopische Befunde
4	Diskussion
5	Zusammenfassung
6	Literatur
7	Anhang (Abb. 4 - 15)
Lebenslauf	

Einleitung

Trotz der großen Bedeutung, die die experimentelle Teratologie seit dem Bekanntwerden der Thalidomid-Katastropfe Anfang der 60er Jahre gefunden hat, bestehen noch viele Lücken in unseren Kenntnissen über den Wirkungsmechanismus der meisten der im Nagetierexperiment als teratogen befundenen Substanzen (Neubert et al. 1970; Jahresbericht 1969/70 und 1971/72 des Sonderforschungsbereichs 29).

Ungeklärt ist z.B. das Problem der Übertragbarkeit von Tierexperimenten auf die Verhältnisse in der menschlichen Schwangerschaft, nachdem inzwischen auch die Grenzen bei der Verwendung von Primaten (Wilson, 1971) für die experimentelle Teratologie zutage getreten sind.

In der Praxis hat sich folgende Einteilung der Pharmaka nach ihrem teratogenen Risiko eingebürgert (Wilson, 1973):

a) Sicher teratogen beim Menschen sind z.B. Thalidomid, Aminopterin und Methotrexat, organische Hg-Verbindungen sowie androgene Hormone.

b) Verdächtig teratogen beim Menschen sind z.B. Salicylate, verschiedene Alkaloide, Tranquilizer, Antihistamine, einige Antibiotika, Corticoide und den Blutzucker herabsetzende Pharmaka, alkylierende Substanzen, weiter einzelne Antimalariamittel, Anästhetika, Antimetaboliten, verschiedene organische Lösungsmittel und Pestizide.

Während für die Substanzen unter a) direkte klinische Befunde vorliegen, die sie als teratogen beim Menschen ein-

stufen, liegen für die umfangreiche und nur unvollständig aufgelistete zweite Gruppe erwiesene teratogene Wirkungen bei Säugetieren vor. Die Furcht vor dem Risiko medikamentös bewirkter Mißbildungen hat heute dazu geführt, daß Substanzen, die im pharmakologischen Screening Hinweise auf Teratogenität bei Verwendung höchster Dosen zeigen, oftmals trotz guter pharmakologischer Wirkungen aus der weiteren Forschung ausgeschlossen werden. Zum anderen tauchen in zunehmendem Maß Schutzbehauptungen seitens der Pharma-Industrie auf, die die Frühschwangerschaft, oftmals sogar die gesamte Schwangerschaft inklusive der Stillzeit als (relative) Kontraindikation für eine bestimmte Medikation bezeichnen.

Ausnahmen hiervon sind z.B. Substanzen, die der Therapie maligner Tumore dienen und oft auch immunsuppressiv wirken. Bei nicht erkannter Frühschwangerschaft oder bei genau abgewogenem Risiko werden auch in der Schwangerschaft derartige Pharmaka häufig sogar auch kombiniert eingesetzt. Die Kenntnis ihres teratogenen Risikos ist deshalb besonders wichtig. Untersuchungen zur tierexperimentellen Wirkung dieser Substanzen haben also direkte Bedeutung für die Klinik. In der vorliegenden Untersuchung finden die Cytostatika Azathioprin (Imuran ^{R}) und Cyclophosphamid (Endoxan ^{R}) Verwendung.

Die Cytostatica allgemein lassen sich nach ihrem Wirkungsmechanismus einteilen (z.B. Neubert 1968) in:

1. Pharmaka, die direkt mit DNS Komplexe bilden,
2. alkylierende Substanzen
3. Antimetaboliten (Purin-, Pyrimidin-, Folsäure-Antagonisten),
4. Mitosehemmstoffe,
5. sonstige zytostatisch wirkende Stoffe (z.B. Natulan, L-Asparaginase).

Cyclophosphamid zählt zu den alkylierenden Substanzen, Azathioprin zu den Purin-Antagonisten. Beide Substanzen werden im Organismus zunächst in ihre wirksamen Verbindungen umgewandelt. Der Wirkungsmechanismus alkylierender Substanzen ist - trotz ausgedehnter pharmakologischer Bemühungen - noch immer ungeklärt (vgl. Köhler und Merker, 1973; Short und Gibson, 1974).

Azathioprin wirkt vermutlich nach seiner Umwandlung als 6-Mercaptopurin und damit als "unphysiologisches" Purin hemmend auf die Synthese von Adenin - und Guanin-Nukleotiden, Vorstufen der Nukleinsäuren (Wilson, 1964; Tuchmann-Duplessis und Mercier-Parot, 1965; Tuchmann-Duplessis, 1969; Scheiffarth und Warnatz, 1969; Kaplan und Calabresi, 1973; Chalmers, 1974; Gerebtzoff et al., 1972).

Für die verzögerte cytotoxische Reaktion, studiert an Tumorzellstämmen, nehmen neuerdings Tidd and Paterson (1974) als Wirkungsmechanismus des 6-Merkaptopurin dessen Umwandlung

1. Referent: Prof. Dr. med. H.-J. MERKER

2. Referent: Prof. Dr. Willy Schwarz

Tag der Promotion: 28.6.76

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Herrn Prof. Dr. H.-J.Merker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die Anregung zur Arbeit, Diskussion und nicht zuletzt Beschaffung des Materials danke ich Herrn Prof. Dr. Milan Pospisil.

Mein Dank für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gilt ebenfalls Herrn Dr. Richard Roetz.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung
2	Material und Methoden
3	Ergebnisse
3.1	Morphometrische Daten des foetalen Skeletts
3.1.1	nach Azathioprin
3.1.2	nach Cyclophosphamid
3.1.3	nach Azathioprin und Cyclophosphamid
3.2	Beschreibung der Mißbildungen
3.3	Histologische Befunde
3.4	Elektronenmikroskopische Befunde
4	Diskussion
5	Zusammenfassung
6	Literatur
7	Anhang (Abb. 4 - 15)

Lebenslauf

Einleitung

Trotz der großen Bedeutung, die die experimentelle Teratologie seit dem Bekanntwerden der Thalidomid-Katastropfe Anfang der 60er Jahre gefunden hat, bestehen noch viele Lücken in unseren Kenntnissen über den Wirkungsmechanismus der meisten der im Nagetierexperiment als teratogen befundenen Substanzen (Neubert et al. 1970; Jahresbericht 1969/70 und 1971/72 des Sonderforschungsbereichs 29).

Ungeklärt ist z.B. das Problem der Übertragbarkeit von Tierexperimenten auf die Verhältnisse in der menschlichen Schwangerschaft, nachdem inzwischen auch die Grenzen bei der Verwendung von Primaten (Wilson, 1971) für die experimentelle Teratologie zutage getreten sind.

In der Praxis hat sich folgende Einteilung der Pharmaka nach ihrem teratogenen Risiko eingebürgert (Wilson, 1973):

a) Sicher teratogen beim Menschen sind z.B. Thalidomid, Aminopterin und Methotrexat, organische Hg-Verbindungen sowie androgene Hormone.

b) Verdächtig teratogen beim Menschen sind z.B. Salicylate, verschiedene Alkaloide, Tranquilizer, Antihistamine, einige Antibiotika, Corticoide und den Blutzucker herabsetzende Pharmaka, alkylierende Substanzen, weiter einzelne Antimalariamittel, Anästhetika, Antimetaboliten, verschiedene organische Lösungsmittel und Pestizide.

Während für die Substanzen unter a) direkte klinische Befunde vorliegen, die sie als teratogen beim Menschen ein-

stufen, liegen für die umfangreiche und nur unvollständig aufgelistete zweite Gruppe erwiesene teratogene Wirkungen bei Säugetieren vor. Die Furcht vor dem Risiko medikamentös bewirkter Mißbildungen hat heute dazu geführt, daß Substanzen, die im pharmakologischen Screening Hinweise auf Teratogenität bei Verwendung höchster Dosen zeigen, oftmals trotz guter pharmakologischer Wirkungen aus der weiteren Forschung ausgeschlossen werden. Zum anderen tauchen in zunehmendem Maß Schutzbehauptungen seitens der Pharma-Industrie auf, die die Frühschwangerschaft, oftmals sogar die gesamte Schwangerschaft inklusive der Stillzeit als (relative) Kontraindikation für eine bestimmte Medikation bezeichnen.

Ausnahmen hiervon sind z.B. Substanzen, die der Therapie maligner Tumore dienen und oft auch immunsuppressiv wirken. Bei nicht erkannter Frühschwangerschaft oder bei genau abgewogenem Risiko werden auch in der Schwangerschaft derartige Pharmaka häufig sogar auch kombiniert eingesetzt. Die Kenntnis ihres teratogenen Risikos ist deshalb besonders wichtig. Untersuchungen zur tierexperimentellen Wirkung dieser Substanzen haben also direkte Bedeutung für die Klinik. In der vorliegenden Untersuchung finden die Cytostatika Azathioprin (Imuran ^{R}) und Cyclophosphamid (Endoxan ^{R}) Verwendung.

Die Cytostatica allgemein lassen sich nach ihrem Wirkungsmechanismus einteilen (z.B. Neubert 1968) in:

1. Pharmaka, die direkt mit DNS Komplexe bilden,
2. alkylierende Substanzen
3. Antimetaboliten (Purin-, Pyrimidin-, Folsäure-Antagonisten),
4. Mitosehemmstoffe,
5. sonstige zytostatisch wirkende Stoffe (z.B. Natulan, L-Asparaginase).

Cyclophosphamid zählt zu den alkylierenden Substanzen, Azathioprin zu den Purin-Antagonisten. Beide Substanzen werden im Organismus zunächst in ihre wirksamen Verbindungen umgewandelt. Der Wirkungsmechanismus alkylierender Substanzen ist - trotz ausgedehnter pharmakologischer Bemühungen - noch immer ungeklärt (vgl. Köhler und Merker, 1973; Short und Gibson, 1974).

Azathioprin wirkt vermutlich nach seiner Umwandlung als 6-Mercaptopurin und damit als "unphysiologisches" Purin hemmend auf die Synthese von Adenin - und Guanin-Nukleotiden, Vorstufen der Nukleinsäuren (Wilson, 1964; Tuchmann-Duplessis und Mercier-Parot, 1965; Tuchmann-Duplessis, 1969; Scheiffarth und Warnatz, 1969; Kaplan und Calabresi, 1973; Chalmers, 1974; Gerebtzoff et al., 1972).

Für die verzögerte cytotoxische Reaktion, studiert an Tumorzellstämmen, nehmen neuerdings Tidd and Paterson (1974) als Wirkungsmechanismus des 6-Merkaptopurin dessen Umwandlung

in 6-Thioguanin-Nukleotide an, die dann in DNS inkorporiert werden sollen.

Embryotoxische bzw. teratogene Wirkungen im Tierversuch sind von beiden Verbindungen bekannt (Azathioprin: z.B. Tuchmann-Duplessis und Mercier-Parot, 1966; Tuchmann-Duplessis, 1969 - Cyclophosphamid: z.B. Hackenberger und v. Kreybig, 1965; v. Kreybig und Schmidt, 1967; Schmidt, 1967; Merker et al., 1968, 1975; Singh and Sanyal, 1974; Gebhard, 1970).

Bei dem wahrscheinlich unterschiedlichen Angriffspunkt und Wirkungsmechanismus beider Substanzen war es interessant, ihre Kombinationswirkung zu erfassen. Kochs (1972) und Kloppenburg (1972) haben - erstere mit den hier verwendeten Substanzen, letzterer unter Einsatz von Cyclophosphamid und Actinomycin D, mit klassischer teratologischer Methodik diese Problematik aufgegriffen. Kochs fand nur für qualitative Veränderungen am Os interparietale mit niedrig dosierten Substanzkombinationen eine gewisse "Potenzierung" der teratogenen Wirkung, dagegen an Wirbelkörpern, am Os parietale und bei höherer Dosierung auch am Os interparietale eine antagonistische Wirkung der beiden Cytostatika. Kochs (1972) hat eine qualitative Inspektion der aufgehellten Skelettpräparate vorgenommen, daneben eine Auszählung der Ossifikationspunkte.

Zum Studium antagonistischer oder synergistischer Teratogenwirkungen von Substanzkombinationen bietet sich jedoch die

Längenmessung der Skelettelemente an, die den Hauptteil dieser Dissertation bilden. Die bisher allgemein angewandten Methoden zur Erfassung von Mißbildungen scheinen zu genaueren Aussagen, besonders zur Aufstellung exakter Dosis-Wirkungsbeziehungen, noch zu grob zu sein.

Am Skelettsystem werden bei der Aufhellungsmethode, die fast ausschließlich verwendet wird, nur ausgeprägte Hypoplasien und Aplasien sowie deutliche Abweichungen von der Form registriert. Um aber genaue Dosiswirkungskurven aufstellen zu können,eignet sich dieses Vorgehen nicht. Es wäre deshalb wünschenswert, auch geringere Abweichungen zu erfassen und auszuwerten. Siegert (1975) hat aus diesem Grunde versucht, das Wachstum und den Reifungszustand des Skelettsystems durch genaue Messungen der mineralisierten Abschnitte quantitativ zu erfassen. Als Arbeitshypothese schwebt vor, daß es neben Aplasien und ausgeprägten Hypoplasien auch alle Grade von Verkürzungen bis hin zu Normwerten geben müsse, die man mit einer exakten morphometrischen Meßtechnik auswerten können sollte (Merker et al., 1975).

Über den Angriffspunkt der beiden hier verwendeten Substanzen am Gehirn ist unter morphologischem Aspekt bereits eine gesicherte Vorstellung entwickelt worden. Ihre morphologischen Effekte unterscheiden sich jedoch wesentlich voneinander im histologischen Bild (Schmidt 1967;v. Kreybig 1968;

Merker et al., 1968; Merker , 1975; Fröhlich, 1975). Nach Cyclophosphamid treten zahlreiche Nekrosen in der Mittelschicht der Wand der Hirnanlage auf, während nach Azathioprin keine strukturellen Veränderungen in diesem Bereich nachgewiesen werden konnten. Aus verschiedenen Veröffentlichungen über die Wirkung von Cyclophosphamid geht hervor, daß sich die Menge der Nekrosen dosisabhängig entwickelt, außerdem läßt sich eine deutliche Tendenz zur Reparation beobachten, die bei den niedrigsten Dosierungen am deutlichsten ist (Fröhlich, 1975; Köhler and Merker, 1973). Diese quantitativen Aspekte weisen auch auf mögliche Ursachen der Extremitätenmißbildungen hin. Die zentrale Stellung des Blastems bei der Entstehung der Skelettmißbildungen ist immer wieder betont worden (Merker et al., 1975a). Der empfindliche Zustand des Blastems gegenüber Substanzen, die in den Nukleinsäurestoffwechsel eingreifen, ist verständlich, da hier gleichzeitig heftige Proliferation und intensive Differenzierung ablaufen. Die sogenannte klassische "kritische Periode" stimmt daher mit dem Blastemstadium überein (Merker et al., 1975a,b). Das Ausmaß der Schädigung bzw. die Menge des Blastems könnte aber für den Typ der resultierenden Skelettveränderungen, nach den bisher vorliegenden Veröffentlichungen, ausschlaggebend sein (siehe auch Grüneberg, 1963). Unterschreitet das Blastem durch vorhergehende Schädigung, z.B. Mitosestop, Nekrosen etc. eine "kritische" Menge, so unterbleibt die

Knochenbildung (Aplasie). Liegt nur eine teilweise Schädigung vor, resultiert eine Hypoplasie in Abhängigkeit von der überlebenden Blastemmenge. Beweisbar wäre diese Hypothese durch den morphologischen Nachweis einer Schädigung im Blastem der Extremitätenknospe nach Gabe von teratogenen Substanzen bzw. Substanzkombination mit ihren unterschiedlichen Folgen, eine Dosisabhängigkeit und die Existenz einer Korrelation dieser Veränderung mit den gemessenen Längenwerten der verschiedenen Skelettelementen.

Am hier behandelten speziellen Beispiel würde diese Vorstellung bedeuten, daß bei den schon von Kochs (1972) festgestellten antagonistischen Wirkungen von Cyclophosphamid und Azathioprin im teratologischen Experiment geringere Veränderungen licht- und elektronenmikroskopisch erfaßt werden müssen. Nach den vorliegenden vorläufigen Befunden (Köhler und Merker, 1973; Merker, 1975 pers. Mitt.) wird man nach Cylcophosphamidgaben im Extremitätenblastem Nekrosen erwarten dürfen. Über entsprechende Befunde nach Azatioprin am Extremitätenblastem ist nichts bekannt, zu vermuten ist eine verringerte Anzahl von Nekrosen. Es sollen deshalb in dieser Arbeit

1. das Ausmaß von Hypoplasien im Bereich des mineralisierten Skelettsystems nach Gaben von Cyclophosphamid, Azathioprin und Kombinationen beider Substanzen morphometrisch erfaßt,
2. die unter dieser Behandlung auftretenden morphologischen Veränderungen in der Extremitätenanlage dargestellt , und

3. beide Befundreihen miteinander korreliert werden.

Nur so gelingen Einblicke in den Entstehungsmechanismus der resultierenden Mißbildungen und eine Erklärung der zunächst nur als Phänomen erfaßbaren Resultate von Arzneimittelkombinationen.

Es soll an dieser Stelle betont werden, daß das Problem einer Wirkung teratogener Substanzkombinationen besonders aktuell und wichtig ist, da solche Situationen nach heutigen Erfahrungen sehr häufig sind. Hier liegen jedoch nur spärliche Erfahrungen und Befunde vor.

Material und Methoden

Die mütterlichen Wistarratten (Stamm SW 69) erhielten ad libitum Altromin R-Futter und hatten freien Zugang zu Leitungswasser. Die Zucht erfolgte bei 25° C Zuchtraumtemperatur und 50 - 60 % Luftfeuchte. Zur exakten Bestimmung der Befruchtung wurden die Tiere in einem veränderten Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, die Lichtperiode dauerte von 12 Uhr mittags bis 4 Uhr morgens. Zur Paarung wurde morgens zwischen 8 und 10 Uhr zu je drei Weibchen ein Männchen gesetzt. Nach der Paarung wurden die Vaginalabstriche auf die Anwesenheit von Spermien untersucht. Bei positivem Spermiennachweis kam es in durchschnittlich 80 % zu einer Schwangerschaft. Der Tag des positiven Spermiennachweises wurde als Tag Null bezeichnet. Die Substanzen wurden jeweils morgens zwischen 8 und 10 Uhr appliziert. Cyclophosphamid (Endoxan ^{R}, Asta-Werke, Brackwese) injizierten wir intraperitoneal. Azathioprin (Imuran^{R}, Wellcome Foundation, London) wurde in 0,9%iger NaCl-Lösung unter tropfenweiser Zugabe von 1 n NaOH bei stetem Rühren und leichtem Erwärmen vorsichtig gelöst und dann oral (Schlundsonde) appliziert. Angaben über Dosierung und Applikations-Zeitpunkte sind aus dem Versuchsschema in Abbildung 1 ersichtlich.

Die Foeten wurden den Muttertieren am Tag 21 durch Sectio entnommen und zunächst 14 Tage in 10 %iger Formalinlösung

fixiert. Anschließend wurden Haut, Augen, das subepidermale Fettgewebe und sämtliche Eingeweide entfernt, der Restfoetus eine Stunde in destilliertem Wasser gewaschen und dann anschließend für 12 Stunden in Aceton gelegt, das nach den ersten 20 Minuten einmal gewechselt wurde.

In Anlehnung an Angaben bei Burdi (1965), Burdi und Flecker (1968) sowie Jensh and Brent (1966) erfolgte die eigentliche Aufhellung der Embryonen und Anfärbung des Skeletts durch 6- 8tägiges Behandeln der Foeten mit 10%iger KOH, in der 6 mg Alizarin/1000 ml gelöst wurden. Die Lösung wurde jeweils bei Braunfärbung gewechselt. In den letzten beiden Tagen der Prozedur wurde die 10%ige KOH durch eine 1%ige Lösung ersetzt. Die aufgehellten und angefärbten Foeten wurden für 12 Stunden in ein 1 : 2 : 2-Gemisch aus Benzylalkohol, Äthanol und Glyzerin übertragen und danach bis zur Messung in Glyzerin aufbewahrt.

Die Messung erfolgte mit dem Zeiss-Meßokular, wobei zehn Skalenteile 1 mm entsprachen. Neuerdings verwenden wir auch zum Messen ein cylophotometrisches Abtastverfahren durch Anwendung des Digiscan der Firma Kontron, München. Die gemessenen Längen der einzelnen Skelettelemente sowie die ausgezählten Ossifikationspunkte wurden in Meßblätter übertragen, aus denen dann die Durchschnittswerte der einzelnen Versuchsgruppen sowie deren statistische Variation berechnet

wurden. Zu statistischen Vergleichen wurde der übliche t-Test verwendet. Die untersuchten Skelettelemente sind aus der Tabelle 1 ersichtlich. Insgesamt wurden 406 Foeten untersucht, wobei über 10.000 Einzelmessungen notwendig waren.

Aus diesen Versuchsreihen bzw. aus extra durchgeführten Versuchen unter identischen Bedingungen wurde Material auch für die elektronenmikroskopischen und lichtmikroskopischen Untersuchungen entnommen:

1,3,6,12,24,48 Std. nach der letzten Injektion (bei Einzelgaben der Substanzen) bzw. nach der Cyclophosphamidgabe in den Kombinationsversuchen wurden die Embryonen entnommen und sofort in eine modifizierte Karnovsky-Lösung eingebracht. Andere Entnahmezeitpunkte sind bei den Bildern jeweils vermehrt. Sie bestand aus 3%igen Paraformaldehyd und 3% Glutaraldehyd in Cacodylat-Puffer bei pH7. Nach mehrstündiger Fixierung u. Waschen in Puffer-Lösung erfolgte eine Nachfixierung in 1%iger OsO_4-Lösung in Phosphatpuffer. Daran schloß sich die Entwässerung in der Acetonreihe und die Einbettung in Micropal (Fa. Ferak, Berlin) an. Die Schnitte wurden an Reichert- und LKB-Mikrotomen, die Photographien am Zeiss EM 10 und am Siemens Elmiskop 101 hergestellt. Die Kontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat. Zur besseren Orientierung im Präparat, zur Suche der geeigneten Areale und zur Kontrolle der elektronenmikroskopischen Bilder wurden darüberhinaus etwa 1 µ dicke Schnitte

hergestellt (Semidickschnitte) und mit Giemsalösung gefärbt. Sie lassen sich zwar nicht mehr differenzieren, stellen aber die Strukturen sehr gut dar.

lle 1 - Zusammenfassung der Meßwerte

uchsgruppe:	A	B	C	D	E	F	G	H	Ko.
ettelemente									
terparietale :	1,73 ±0,23	1,57 ±0,33	1)	1,53 ±0,33	1,79 ±0,19	1,80 ± 0,27	1,62 ± 0,33	1,62 ±0,33	1,51 ± 0,16
:	4,71 ± 0,42	4,73 ±0,41	1)	4,37 ±0,10	4,84 ± 0,21	3,94 ± 0,10	4,66 ± 0,44	4,66 ± 0,43	4,86 ± 0,54
m (OP)	4,29 ± 0,62	4,20 ± 0,56	2,47 ± 0,14	3,50 ± 1,39	4,90 ± 1,61	2,60 ± 1,40	3,48 ± 1,29	4,20 ± 0,60	4,59 ± 0,60
(Zahl)	13	13	13	13	13	13	13	13	13
us-Länge :	2,57 ± 0,16	2,31 ± 0,30	2,49 ± 0,22	2,50 ±0,20	2,51 ± 0,13	2,36 ± 0,17	2,50 ± 0,20	2,49 ± 0,17	2,58 ± 0,16
	2,57 ± 0,16	2,31 ± 0,30	2,49 ± 0,21	2,44 ± 0,21	2,49 ± 0,12	2,36 ± 0,17	2,49 ± 0,16	2,48 ± 0,15	2,65 ± 0,20
Länge :	2,67 ± 0,19	2,44 ± 0,19	2) 2,33 ± 0,33	2,58 ± 0,22	2,61 ± 0,12	2,48 ±0,17	2,54 ± 0,19	2,64 ± 0,19	2,67 ±0,19
	2,67 ±0,19	2,44 ±0,19	2,32 ±0,33	2,55 ±0,22	2,54 ± 0,15	2,45 ± 0,18	2,52 ± 0,21	2,61 ± 0,18	2,65 ± 0,20
-Länge :	2,05 ±0,12	1,78 ± 0,32	1,80 ± 0,32	2,00 ± 0,19	2,00 ± 0,13	1,92 ± 0,12	1,91 ± 0,19	1,97 ± 0,16	2,09 ± 0,15
:	2,05 ± 0,12	1,78 ±0,32	1,81 ± 0,32	2,00 ± 0,19	1,96 ± 0,10	1,92 ± 0,12	1,90 ± 0,19	1,97 ± 0,15	2,09 ±0,16
carpalia (OP) = links	3	3	3	3	3	2,95 ± 0,30	3	2,97 ± 0,30	3

Tabelle 1 - Zusammenfassung der Meßwerte (Fortsetzung)

Versuchsgruppe:	A	B	C	D	E	F	G	H	Ko.
Skelettelemente									
Femur-Länge rechts:	1,86	1,64	1,62	1,69	1,72	1,58	1,69	1,74	1,76
	± 0,13	±0,15	±0,14	± 0,19	± 0,12	± 0,12	± 0,14	± 0,16	± 0,1
links:	1,86	1,64	1,62	1,69	1,72	1,58	1,69	1,76	1,76
	± 0,13	±0,15	± 0,16	± 0,19	± 0,12	± 0,12	± 0,14	± 0,17	± 0,1
Tibia-Länge rechts:	2,26	1,95	1,90	2,06	2,13	1,88	2,06	2,11	2,10
	± 0,13	±0,26	± 0,29	± 0,23	± 0,14	± 0,17	± 0,17	± 0,26	± 0,1
links:	2,26	1,95	1,89	2,06	2,13	1,88	2,06	2,15	2,10
	± 0,13	±0,26	± 0,22	± 0,23	±0,14	± 0,17	± 0,17	± 0,17	± 0,1
Fibula-Länge rechts:	2,02	1,84	1,82	1,92	1,97	1,76	1,89	1,95	2,00
	± 0,14	±0,16	± 0,25	± 0,22	± 0,13	± 0,17	±0,16	± 0,15	± 0,2
links:	2,02	1,84	1,89	1,92	1,97	1,76	1,89	1,95	1,99
	± 0,14	±0,16	± 0,25	± 0,22	± 0,13	±0,17	± 0,16	± 0,15	± 0,1
Vertebrae (OP)			3)						
cervicales	7	7	7	7	7	7	7	7	7
dorsales	13	13	13	13	13	13	13	13	13
lumbales	6	6	6	6	6	6	6	6	6
sacrales	4	4	4	4	4	4	4	4	4
caudales	2,54	1,83	1,91	1,84	2,36	1,70	2,05	2,30	2,97
	± 0,83	± 0,87	± 0,12	± 1,15	± 0,65	± 1,10	± 0,87	± 0,60	± 0,0
Metatarsalia (OP) rechts = links	4	4	4	4	4	3,60 ± 0,27	4	4	4
Scapula (OP)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Clavicula (OP)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ossa coxae	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Anmerkungen: 1) Schadeldach fehlt, 2) bei 6 Foeten nicht vorhanden, 3) Wirbelkorper verschmolzen

Erlauterungen: A - H Versuchsgruppen
Ko Kontrollgruppe (s. Abb. 1)
Langenangaben in mm

OP = Zahl der vorhandenen Ossifikationspunkte, Zahlenangaben = Mittelwert
± Streuung der Einzelwerte, unterstrichene Zahlen sind signifikant mit P<
von den entsprechenden Kontrollwerten unterschieden. + bedeutet vorhanden

3. Ergebnisse

3.1 Morphometrische Daten des foetalen Skeletss.

Die unter den Bedingungen (Abb. 1) dieser Arbeit applizierten Substanzen und Substanz-Kombinationen waren ohne Einfluß auf die Zahl der Rippen, die Zahl der Ossifikationszentren der Metacarpalia und Metatarsalia (eine Ausnahme), der Scapula, Clavicula und Ossa coxae sowie der Vertebrae cervicales, dorsales, lumbales et sacrales. Die Entwicklung dieser Skelettelemente bei der foetalen Ratte wird anscheinend durch die Applikation der Substanzen nicht mehr (Achsenskelett) bzw. noch nicht (Endabschnitte der Extremitäten) erreicht. Die nachstehenden Ausführungen lassen daher die Werte dieser im Vergleich zu den Kontrollen unveränderten Elemente außer acht.
Des weiteren wurde eine Seiten-Verschiedenheit der Wirkung auf paarige Skelettelemente nicht beobachtet.
Die metrischen Ergebnisse sind mit ihrer Variation in Tabelle 1 zusammengefaßt und in Abb. 2 dargestellt.

3.1.1 nach Azathioprin

Bei alleiniger Applikation von 5 bzw. 15 mg Azathioprin/kg/d (Gruppen E und D) an den Tagen 11 - 14 der intrauterinen Entwicklung läßt sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung auffinden. Die Länge des Os interparietale erreicht unter der höheren Dosierung den größten, signifikant von den Kontrollfoeten sich unterscheidenden Wert (1,79 mm gegenüber 1,51mm der Kontrollen). Für alle anderen Skelettelemente führt

Abbildung 1:

Behandlungsplan der einzelnen Versuchsgruppen

Gruppe:	A	B	C	D	E	F	G	H	Ko.
Zahl der untersuchten Rattenfoeten:	24	36	95	38	22	43	35	44	69

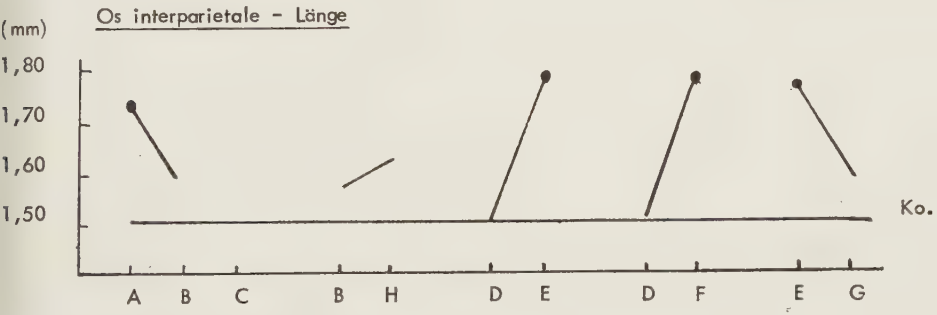
——————— Cyclophosphamid, i.p.

– – – – – Azathioprin, oral / Zahlen in Klammern entsprechen Dosisangabe mg/kg/d

Abbildung 2:

Abhängigkeit der Skelettmaße von den applizierten Substanzen

(●—— Die Punkte bezeichnen von der Kontrollgruppe - Ko - signifikant abweichende Werte).



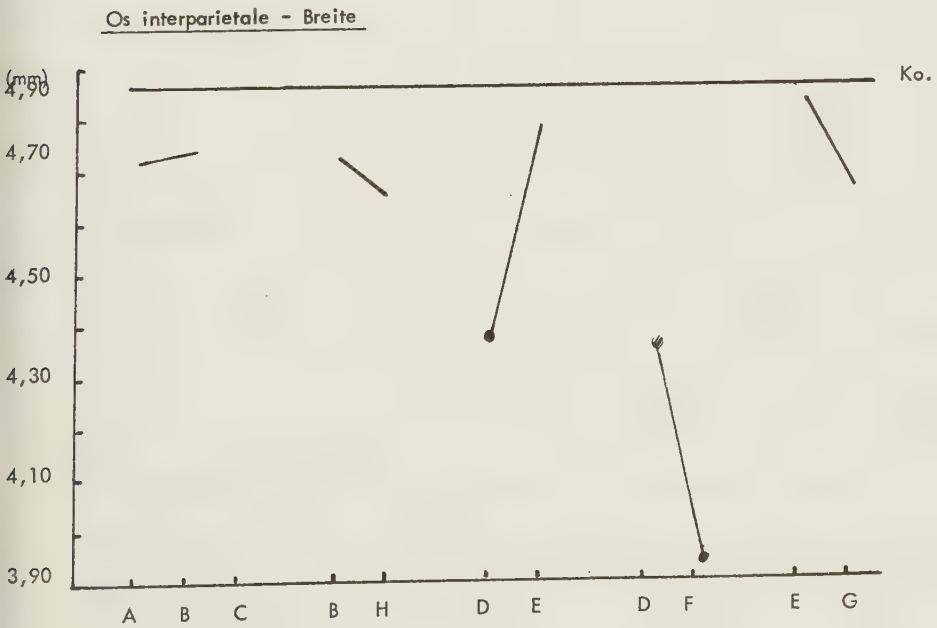


Abbildung 2: (Fortsetzung)

2c) Untere Extremität

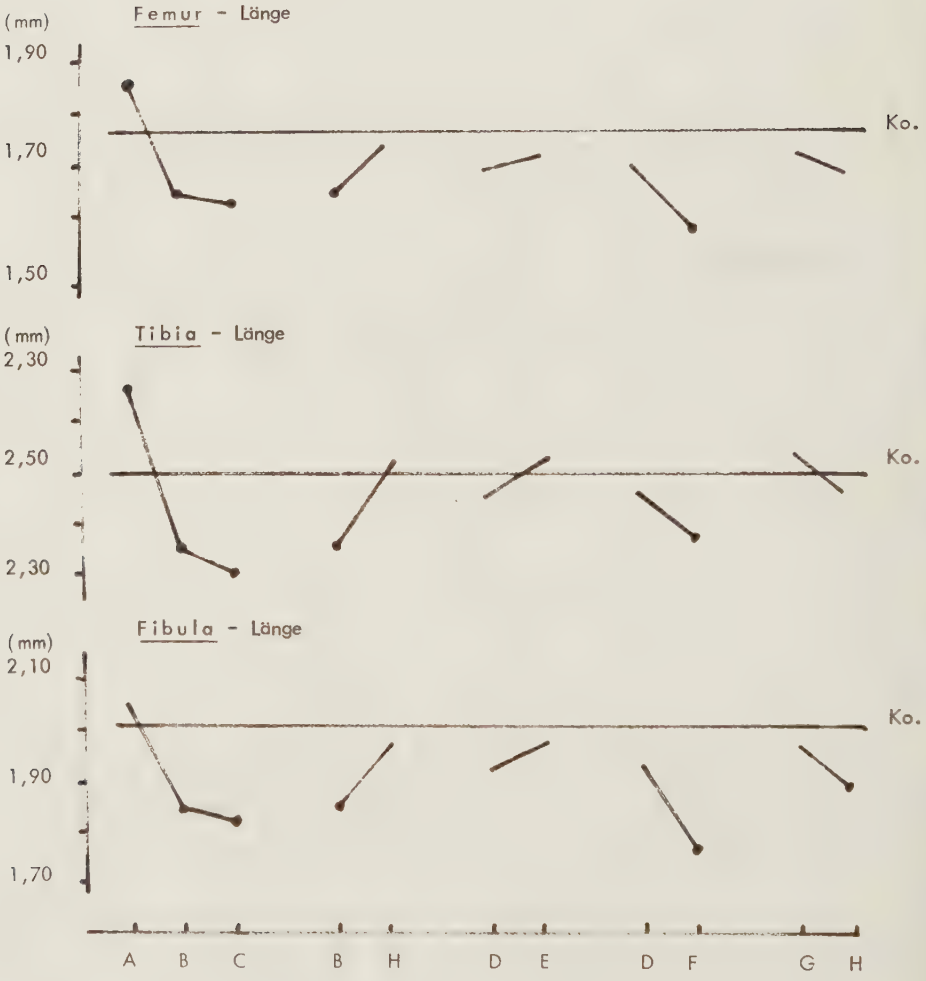


Abbildung 2: (Fortsetzung)

2b) Obere Extremität

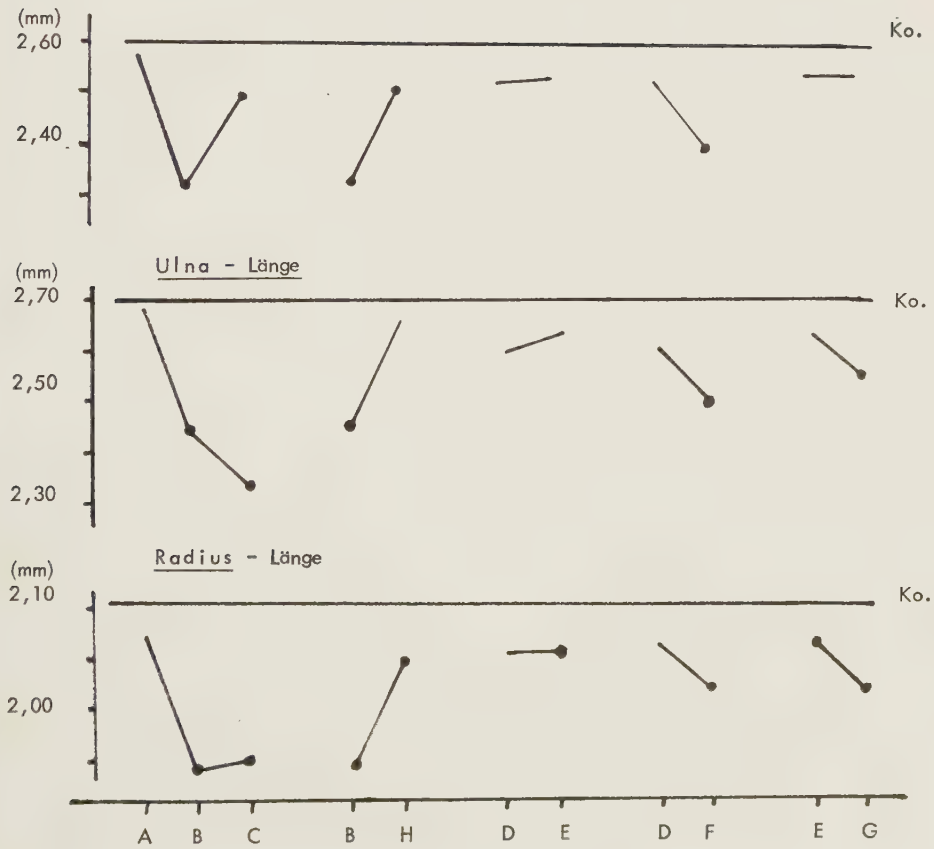
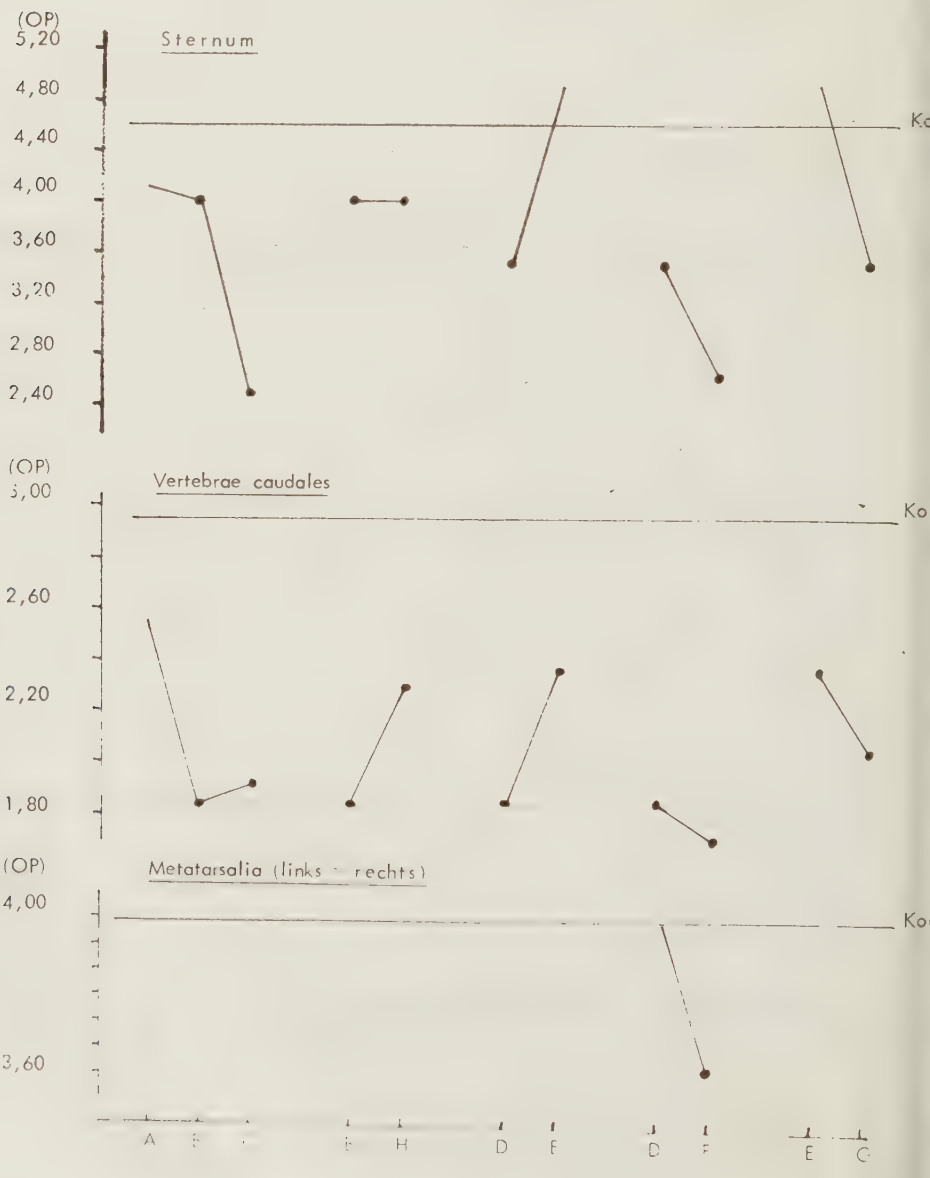


Abbildung _:

Einfluß der applizierten Substanzen und Substanzkombinationen auf die Verknöcherung einiger Skelettelemente der foetalen Wistarrate (OP = Ossifikationspunkte, Zahl, Ko=Kontrolltiere, ●——●: Die Punkte bezeichnen Werte, die signifikant von Ko verschieden sind)



auch die niedrigere Dosis zu einem Effekt (Breite des Os interparietale, Ossifikation des Sterums und der Vertebrae caudales) oder ein Unterschied zwischen beiden Dosierungen ist überhaupt nicht meßbar.

3.1.2 Nach Cyclophosphamid

Bei Anwendung von 4 mg Cyclophosphamid/kg am Tag 11 der intrauterinen Entwicklung (Gruppe A) bleiben die untersuchten Skelettelemente unverändert oder zeigen sogar eine Tendenz zur Größenzunahme - dies gilt besonders für die Längenmaße des OS interparietale, von Femur, Tibia und Fibula, bei denen z.T. (vgl. Tab.1) die Größenzunahme signifikante Abweichungen zu den Kontrollen erreicht.

Bei der Verwendung von 6 mg Cyclophosphamid/kg am Tag 11 der Entwicklung (Gruppe B) sind mit Ausnahme der im Vergleich zu den Kontrollen unveränderten Maße des Os interparietale alle anderen gemessenen Skelettelemente im Vergleich mit den Kontrolltieren in ihren Längen oder der Zahl ihrer Ossifikationszentren reduziert. Zwischen den Gruppen A und B ist eine echte Dosis-Wirkungsbeziehung erkennbar.

Durch Applikation von 10 mg Cyclophosphamid/kg am Tag 12 der intrauterinen Entwicklung (Gruppe C) bleibt die Größenreduzierung im Ausmaß der Gruppe B erhalten. Das Sternum ist noch stärker reduziert, die Länge des Humerus jedoch

geringer verkürzt. Innerhalb dieser Gruppe treten deutliche Mißbildungen auf, die speziell den Schädel und die Wirbelsäule, aber auch die langen Extremitäten betreffen.

3.1.3 Nach Azathioprin und Cyclophosphamid

Die Kombination der Pharmaka in Gruppe F, die der Azathioprin-Gruppe D (5 mg am Tag 11-14) mit zusätzlicher Applikation von 4 mg Cyclophosphamid/kg am Tag 12 entspricht, hat die stärkste reduzierende Wirkung auf die Skelettelemente. Eine Ausnahme bildet auch hier die Länge des Os interparietale, die in dieser Gruppe ihren Maximalwert erreicht. Nur in diesem Versuchsansatz wird auch eine Abnahme der Ossifikationspunkte der Metatarsalia beschrieben. Mißbildungen wurden jedoch nicht gefunden.

Nach den metrischen Daten hat die bei gleichem Applikationsschema wie in F in G verdreifachte Azathioprin- und um 50 % erhöhte Cyclophosphamid-Dosis keine Verstärkung, sondern eine starke Abschwächung der intrauterinen Skelettretardierung zur Folge.

In der Gruppe G sind nur noch Sternum, Ulna, Radius, Fibula und Vertebrae caudales von der Reduktion betroffen, trotzdem kommt die zusätzliche, verstärkende Wirkung der Cyclophosphamid-Dosis in einem Vergleich der Tiere der Gruppen E (15 mg Azathioprin kg/d Tag 11-14) und G (zusätzlich zu E 6mg Cyclophosphamid /kg/d Tag 12) noch zur Geltung. Ein Vergleich der Daten der Gruppen B (6mg Cyclophosphamid/kg/d, Tag 10-13) (Abb. 2) zeigt wieter, daß höher dosiertes

Azathioprin (15mg/kg/d, Tag 10-13) wie im zuvor beschriebenen Fall eine Abschwächung des Cyclophosphamid-Effektes bewirken kann wenn man die hier berücksichtigten Messungen verwertet.

3.2 Beschreibung der Mißbildungen

In allen Gruppen, die nur Azathioprin ohne Endoxan erhalten haben, ließen sich keine Störungen des mineralisierten Skelettsystems im Sinne von Aplasien, stark ausgeprägten Hypoplasien und Verformungen mit der Alizarin-Aufhellungsmethode nachweisen. Allerdings finden sich in einem hohen Prozentsatz fehlende Ossifikationskerne des Sternums (etwa in 10 %). Daneben kommen immer wieder in einigen Fällen das Fehlen von Rippen und selten einmal Verkleinerungen des Os parietale oder interparietale vor. Die Befunde sind aber nur schwer zu deuten, da dieses Parameter auch bei den unbehandelten Kontrolltieren außerordentlich stark schwanken. Wir haben sie deshalb hier in diesem Zusammenhang nicht weiter berücksichtigt. Einzelheiten können in der Dissertationsarbeit von Kochs (1972) nachgelesen werden. Hier wird außerdem deutlich ein Phänomen gezeigt, das bei teratogenen Arbeiten immer wieder beobachtet werden kann: Die außerordentlichen Wirkungsunterschiede bei den einzelnen Stämmen. Die geringere Mißbildungshäufigkeit in unserem Material bei niedriger Cyclophosphamid-Dosierung (4 und 6 mg/kg) - im Vergleich mit den Werten von Kochs (1972) - muß darauf bezogen werden. Offenbar ist der von uns benutzte SW 69-Stamm weniger empfindlich.

Bei der mit 4 mg/kg Cyclophosphamid behandelten Tiergruppe ließen sich klassische Mißbildungen nicht beobachten. Die Gruppe der mit 6 mg/kg behandelten Tiere zeigte im wesentlichen nur mit mikroskopischer Messung erfaßbare Veränderungen im Sinne einer Reduktion der langen Knochenstücke.

Nach einer Behandlung des Muttertieres mit 10 mg/kg entstehen am mineralisierten Skelettsystem der Foeten kurz vor der Geburt (Tag 20 der Schwangerschaft) deutliche, mit der Alizarin-Aufhellungsmethode sicher faßbare Mißbildungen. In sechs Fällen fehlte je eine Ulna. Häufig waren keine Ossa metacarpalia oder metatarsalia nachweisbar. Da dieser Wert aber - wie oben bereits erwähnt - auch schon im Vergleichsmaterial der Kontrolltiere außerordentlich schwankt, soll hier auf diesen Befund nicht näher eingegangen werden. Diese Knochen entstehen und mineralisieren zuletzt. Wenn - wie es hier der Fall ist - eine Retardierung, also ein Größen- und Gewichtsdefizit im Sinne einer Reifungshemmung vorhanden ist, kann in den meisten Fällen vermutet werden, daß die Anlage für diese Knochen zwar vorhanden ist, sie aber noch nicht mineralisiert sind. Weitere Befunde lassen sich am Achsenskelett erheben: Hier kommt es vereinzelt zu Verschmelzungen von Wirbelkörpern, zu mangelhafter Mineralisierung und sogar in wenigen Fällen zum Fehlen von Wirbelkörpern. Auch die Rippen sind betroffen. Hier sind häufig Verkürzungen und

selten einmal Verbiegungen zu sehen. Durch die genuine Krümmung der Rippen ist hier aber eine sichere Erfassung schwierig. Die Auswertung an den Rippen wurde deshalb nicht durchgeführt.

Am deutlichsten waren die Veränderungen des Schädeldaches. In der 10 mg-Gruppe zeigten alle Tiere im Bereich dieser Knochen Abweichungen von der Norm. Die am häufigsten vorkommenden Mißbildungstypen waren das Fehlen des Os parietale, Os interparietale und Os frontale. Interessanterweise fand sich dieser Befund immer auf beiden Seiten. Bei genauerer Durchsicht finden sich neben dem deutlich ins Auge fallenden Fehlen von Schädeldachknochen auch noch kleinere Abweichungen im Bereich des Gesichtsschädels. So kann häufig ein ausgebliebener Verschluß der proc. palatini ossis maxillaris erfaßt werden.

3.3 Histologische Befunde (Abb. 4-6)
(sog. Semidickschnitt-Technik)

Zum Zeitpunkt der Cyclophosphamid-Applikation, also am Tag 11 oder 12, findet sich bei morphologischer Untersuchungen an den Knospen der oberen Extremität zentral ein typisches Blastem: Dichtgepackte, runde bis polygonale Zellen mit großen Kernen ohne Kapillaren und Nerven. Subepithelial und unter der epithelialen Scheitelleiste am Apex der Extremitätenplatte ist ein mehr lockerer, mesenchymähnlicher Zellverband mit vielen Kapillaren lokalisiert. Im Verlauf des Tages 13 läßt sich im proximalen Bereich der Knospe,

der späteren Humerusregion, die erste Knorpelbildung erkennen. Weiter distal schiebt sich das Blastem in die Handanlage vor. Unter dem Epithel bleibt das Gewebe weiterhin etwas aufgelockert. Am Tag 14 beginnt die Knorpelbildung auch in den Anlagen von Radius und Ulna.

Nach Gaben von Cyclophosphamid in allen benutzten Dosierungen (4,6 und 10 mg/kg) entwickeln sich Zellnekrosen. Ihre Zahl ist deutlich dosisabhängig. Während bei 10 mg/kg Cyclophosphamid im zentralen Blastem der Extremitätenknospen etwa 25-35 % der Zellen nekrotisch werden, beträgt dieser Wert nach Gaben von 4 mg/kg nur etwa 10 %.

Auf die statistische Auswertung dieser Ergebnisse muß verzichtet werden, da durch die Dünne des Schnittes, die wechselnden Schnittwinkel und unsichere Abgrenzungen der Frühformen der Nekrosen zuviel verfälschende Faktoren in die Rechnung eingehen würden.

Die Nekrosen sind nach 7 Stunden erstmals deutlich morphologisch faßbar. Die Entwicklung beginnt mit einer Verdichtung und Schrumpfung der Zellen und einer Ausformung plumper Fortsätze. Schließlich fragmentierten diese Zellen. Der Restkern im zentralen Bruchstück wird dabei pyknotisch. Diese Zelltrümmer liegen zunächst im extrazellulären Raum und werden anschließend von Nachbarzellen phagocytiert. Hier sind sie dann intrazellulär als dichte Granula nachweisbar. Liegt die Applikation 48 Stunden zurück, lassen sich fast keine intra- oder extrazellulären Zelltrümmer

mehr nachweisen. Auffällig ist darüberhinaus in diesem Material der Regenerationsversuch des Blastems, der sich morphologisch in den erneut auftretenden Mitosen ausdrückt. Besonders deutlich ist die große Zahl der Mitosen nach Applikation einer niedrigen Dosis (4mg/kg). Sie treten erstmals wieder nach 24 Stunden auf und erreichen nach 48 Stunden (post inj.) einen Höhepunkt. Bei höherer Dosierung (10mg/kg) überschreiten sie nicht das normale Ausmaß der Mitoserate oder bleiben sogar deutlich darunter (Merker, persönl. Mit.).

Nach Gaben Azathioprin in allen Dosierungen lassen sich keine auffälligen Abweichungen vom Normalbild histologisch erfassen. Nekrosen sind - bis auf immer auftretende Einzelnekrosen - nicht vorhanden.

Nach Kombinationsgaben ist die Zahl der Nekrosen zum vergleichbaren Zeitpunkt nach Cyclophosphamid-Applikation deutlich geringer. Nach niedrigen Dosen von Cyclophosphamid allerdings ist dieser Vergleich wegen der primär geringen Zahl der geschädigten Zellen nur schwer durchzuführen, da einzelne Nekrosen immer vorkommen. Bei höheren Dosen allerdings wird der offensichtliche Unterschied klar. Die Nekroserate beträgt nach 15 mg/kg Azothioprin und 10mg/kg Cyclophosphamid etwa 5% (Zahl der nekrotischen Zellen) und entspricht damit dem Wert nach alleiniger Gabe von 4 mg/kg Cyclophosphamid. Die Regenerationsversuche des Blastems in der Extremitätenknospe, die durch die mitotische Aktivität besonders bei niedrigen Dosen Cyclophos-

phamid gut morphologisch zu erfassen sind, lassen sich unter der fortdauernden Azathioprin-Applikation nicht mehr nachweisen. Die Zahl der Mitosen ist unter diesen Bedingungen außerordentlich gering.

3.4 Elektronenmikroskopische Befunde (Abb. 7-15)

Im elektronenmikroskopischen Bild lassen sich die bisher geschilderten lichtmikroskopischen Befunde bestätigen. Allerdings ist die Übersichtslichkeit bei der elektronenmikroskopischen Technik wegen der geringen Größe und Dicke des Schnittes viel geringer und damit weniger aussagekräftig. Geeigneter ist dagegen die Technik für die Darstellung qualitativer Veränderungen. Es kann deutlich gezeigt werden, daß es sich bei den beobachteten Veränderungen tatsächlich um Nekrosen handelt. Sie beginnen auch im elektronenmikroskopischen Zellbild mit einer Verdichtung und Schrumpfung. Darauf folgt eine Verformung und schließlich eine Fragmentation. Das zentrale Bruchstück enthält fast immer den pyknotischen Kern. Es folgt die Phagocytose der Fragmente durch Nachbarzellen und die intrazelluläre Verdauung. Die morphologische Ähnlichkeit berechtigt auch ohne Nachweis spezifischer "marker" - Enzyme zu der Annahme, daß dabei das lysosomale System beteiligt ist. Auch elektronenmikroskopisch sind nach 48 Stunden weitgehend alle Zelltrümmer intra- und extrazellulär verschwunden.

4. Diskussion der Ergebnisse

Die Ossifikation der Kontrolltiere und die metrische Entwicklung ihrer Skelettelemente entspricht unter Berücksichtigung einer teilweise unterschiedlichen Zeitzählung der intrauterinen Entwicklung und Unterschieden in der Herkunft der Tiere (Stämme, Zuchten) den Angaben aus der Literatur (Strong, 1925; Henneberg,1937; Wright et al., 1958). Metrische Angaben zum foetalen Rattenskelett sind in der Literatur nur spärlich vorhanden, obgleich die Skelettuntersuchungen heute zum Routine-Screening der industriellen Pharmakologie zählen. Abweichungen zu den bei Fritz und Hell (1970) nachzulesenden Zahlenangaben beziehen sich mit Sicherheit auf die Verwendung von Sprague-Dawley-Ratten, zusätzlich wohl auch auf gewisse methodische Differenzen. Messungen und Daten von mineralisierten Knochenabschnitten, die mögliche Hypoplasien allein statistisch zeigen, liegen erst in jüngster Zeit vor (z.B. Merker et al., 1975). Die zur Anwendung gelangten Substanzdosierungen werden, ausgedrückt in Substanzmenge/kg Körpergewicht/Tag, auch bei der klinischen cytostatischen und immunsuppressiven Therapie mit Azathioprin und Cyclophosphamid erreicht. Einzeldosen von 4, 6 und 10 mg Cyclophosphamid pro Tag umgreifen den Schwellenbereich der teratogenen Wirkung (Gebhardt, 1970, vg. auch Angaben bei v. Kreybig, 1965). Merker et al. (1968) haben bereits mit 7 mg Cyclophosphamid/kg, allerdings an den Tagen 11 - 13 der intrau-

terinen Rattenentwicklung, elektronenmikroskopisch erfaßbare Störungen in der Hirnentwicklung beschrieben, die sich auffallend in einer verminderten Zelladhäsion und im Auftreten von Nekrosen äußerten. 4 mg Cyclophosphamid je kg und Tag waren dagegen ohne Einfluß.

Das Auftreten von Mißbildungen in Versuchsgruppe C zeigt eindeutig, daß hier mit der Dosis von 10 mg Cyclophosphamid am Tag 12 eine spezifisch sensible Phase der Intrauterinentwicklung getroffen wird. Als besonders kennzeichnend tritt hier für die Cyclophosphamid-Wirkung das Fehlen des Schädeldaches (Abb. 20), die Reduktion von Extremitätenanlagen (Abb. 17,18,19) sowie das Auftreten von Fehlbildungen der Wirbelkörper (Abb. 19) in Erscheinung. Die metrischen Daten der Skelettelemente geben die Größenreduktion bzw. verminderte oder fehlende Ossifikation an. Nach der allgemeinen Regel (vgl. hierzu Balinsky, 1960) nach der die Entwicklung der Extremitäten von proximal nach distal fortschreitet, die Vorderextremitäten einen Entwicklungsvorsprung vor den Hinterextremitäten haben und auch in der Entwicklung des Achsenskeletts eine Zunahme von cranial nach caudal auftritt, sind die Wirkungen des Cyclophosphamid in diesen Richtungen graduell abgestuft, wie die Darstellung in Abb. 2 zeigt. Allerdings müssen hier auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen. So kann mit diesem cranio-caudalen Reifungsgefälle allein nicht die eigenartige Wirkung von 6-Mercaptopurin am cau-

dalen und von Cyclophosphamid am cranialen Körpergewicht erklärt werden (v. Kreybig, 1968; Merker et al., 1975a). Trotz Beachtung des Zeitfaktors und Applikation zu verschiedenen Zeiten gelingt es mit diesen Substanzen nicht ein umgekehrtes Mißbildungsmuster zu erzeugen (Merker, pers. Mitteilung). Köhler und Merker (1973) konnten einige Befunde erheben, die auf die Beteiligung von Reparationsmechanismen beim Zustandekommen dieses Phänomens hinweisen. So lassen sich in der oberen und unteren Extremitätenknospe unterschiedliche RNS-Polymerasen-Werte nach Gaben von Cyclophosphamid messen.

Azathioprin allein hat kaum Wirkungen auf die Skelettentwicklung. Bei einem Vergleich der Versuchsgruppen F und G, (Kombination von 5 u 15 mg Azathioprin/kg/d Tag 11-14 mit 4 vzw. 6 mg Cyclophosphamid/kg Tag 12), die bei gleichem zeitlichen Applikationsschema sich durch die höhere Dosierung beider Substanzen in G voneinander unterscheiden, fällt auf, daß die Wirkungen in F sehr viel stärker ausgeprägt sind. In dieser Gruppe wird anscheinend die Wirkung einer unterschwelligen Dosierung von 4 mg Cyclophosphamid/kg am Tag 12 durch die gleichzeitige Verabreichung von 5 mg Azathioprin/kg an den Tagen 11-14 verstärkt, während in G die Wirkung von

6 mg Cyclophosphamid durch die Verabfolgung von 15 mg Azathioprin weitgehend ausgeschaltet werden konnte. In den Versuchen von Tuchmann-Duplessis und Mercier-Parot (1965) bzw. von Tuchmann-Duplessis (1972) werden Mißbildungen beschrieben, die allerdings nach 2,5-80 mg Azathioprin/kg/Tag appliziert an den Tagen 6-12 auftreten, und es wird eine zum Teil vollständige Embryoletalität ab 10 mg Azathioprin/kg/Tag bei Applikation der Substanz an den Tagen 6-10 gefunden. Azathioprin wirkt vermutlich nur über sein endogenes Abbauprodukt 6-Mercaptopurin, das selbst ein starkes Teratogen darstellt (Angaben bei v. Kreybig 1965).

Ob die am vorgelegten Zahlenmaterial beobachtete und schon von Kochs (1972) festgestellte Abschwächung des teratogenen bzw. reduzierenden Cyclophosphamid-Effektes durch höher dosiertes Azathioprin über Stoffwechselinterferenzen unbekannter ARt erfolgt oder an anderen Mechanismen ansetzt, kann nicht beurteilt werden. Scheiffarth (1973) hat in einer Übersicht über Immunsuppressiva das nach amerikanischen Sammelstatistiken signifikant gehäufte Auftreten von Tumoren bei Nierentransplantationen erwähnt, deren Empfänger zur Immunsuppression mit Azathioprin und Cyclophosphamid behandelt wurden. Weiter ist (nach Angaben von Scheiffarth, 1973) durch tierexperimentelle Studien von Schmähl die onkogene Wirkung von Cyclophosphamid, das ja als Cytostatikum eingesetzt wird, eindeutig belegt. Das Wechselspiel beider Substanzkombinationen ist auf jeden

Fall sehr komplex und bedarf zu seiner exakteren Umschreibung noch weiterer Untersuchungen mit feineren Kombinations- und Applikationsabstufungen an einem umfangreicheren Zahlenmaterial.

Auch die histologischen Untersuchungen führen nur zum Teil weiter. Ohne Zweifel besteht in den meisten hier besprochenen Versuchsreihen eine Korrelation zwischen Morphologie und Teratologie. Bei Cyclophosphamid ist die Beziehung zwischen Zahl der Nekrosen im Blastem und Dosis sehr deutlich. Der fehlende Effekt drückt sich bei Azathioprin auch histologisch im Fehlen morphologischer Veränderungen aus. Ähnliches gilt auch für die Kombination hoher Dosen von Cyclophosphamid und Azathioprin. Damit scheint die Erfahrung teratologischer Untersuchungen bestätigt zu werden, daß die meisten teratogenen Schädigungen der Extremitätenentwicklung am Blastem angreifen und hier Nekrosen erzeugen (Merker et al., 1975 b). Das Ausmaß der Nekrose wiederum bestimmt die resultierende Schädigung. Die Korrelation zwischen histologischer Veränderung, d.h. Zahl der morphologisch nachweisbaren Nekrosen einerseits und der Aplasie-Rate bzw. Zahl der ausgeprägten oder aber nur statistisch erfaßbaren Hypoplasien andererseits bestätigt die anfangs formulierte Hypothese, daß bei Berücksichtigung der Länge der sich entwickelnden Röhrenknochen ein kontinuierlicher Übergang zwischen Aplasie über Hyperplasie bis hin zu Normalwerten existiert. Damit gewinnen

aber solche Messungen an enormer Bedeutung. Hypoplasien, so lange sie nicht durch eine allgemeine Retardierung bedingt sind, weisen auf eine Schädigung hin, die bei Verstärkung auch zu Aplasien führen kann. Durch solche Veränderungen läßt sich also das teratogene Risiko besser abschätzen. Außerdem müßte es möglich sein, wie beim Cyclophosphamid angedeutet, auch kontinuierliche Dosis-Wirkungskurven aufzustellen.

Leider geht aus diesen Befunde, wie oben bereits besprochen, kein Hinweis auf die Unterdrückung des Cyclophosphamid-Effektes durch Azathioprin hervor. Die Deutung dieser Wirkung erscheint um so schwieriger als die Ursache der auslösenden Mechanismus, der zur Nekrose führt, noch nicht bekannt ist. Hier werden u.a. DNS- und RNS-Synthesen, die Bildung toxischer Proteine und die Stimulierung von Endonukleasen diskutiert (Schweichel und Merker,1973 , Williams et al., 1974). Wo und wie Azathioprin hier eingreifen sollte, läßt sich aus den morphologischen Befunden allein nicht ablesen. Das Ausbleiben dieses Effektes bzw. seine Verstärkung bei geringen Dosen von Cyclophosphamid und Azathioprin kann auf 2 Phänomenen beruhen: Einmal muß an eine Dosis-Wirkungsbeziehung gedacht werden, d.h. die geringere Dosis von Azathioprin liegt noch unter der Wirkungsschwelle,die bei hohen Dosen bereits überschritten ist. Als 2. Möglichkeit der Erklärung käme die Unterdrückung des Regenerationsversuches in Frage, der bei diesen niedrigen Dosierungen beim Vermeiden des teratogenen Effektes eine wichtige Rolle spielt.

Das würde bedeuten, daß schon nach 4 mg/kg Cyclophosphamid eine Schädigung erzeugt wird, die zu einem deutlichen Effekt führen würde, wenn nicht die folgende ausgelöste Mitose-Aktivität diesen Schaden kompensieren würde. Bei Unterdrückung dieser Kompensation mußte die Schädigung manifest werden. Für die Bedeutung von Kompensationsprozessen zur Vermeidung einer erfaßbaren Schädigung nach 4 mg/kg Cyclophosphamid spricht auch die überschießende Reaktion einiger Knochen nach Applikation dieser Menge. Möglicherweise schießt der Kompensationsversuch über das Ziel hinaus und es werden mehr Blastemzellen gebildet als ursprünglich geplant (Merker et al., 1975c). Wenn die Vorstellung stimmt, daß die Blastemmenge ein kritischer Faktor bei der Erzeugung von Hypo- und Aplasie ist, müßte er auch umgekehrt die Größe oder aber auch die Zahl der entstehenden Skelettstücke im Sinne einer Polydaktylie oder Hyperplasie beeinflussen.

Die metrische Skelettanalyse hat sich in den vorgelegten Versuchen als relativ einfache und wenig aufwendige Methode erwiesen, die überraschend tiefe Einblücke in das teratologische Geschehen gestattet und bisher durch keine anderen Verfahren ersetzt werden kann. Der zweifellos notwendige Zeitaufwand der direkten Messung mit einem Meßokular kann jetzt sogar durch eine automatische Analyse mit dem "Digiscan" vereinfacht und automatisiert werden. Zu beachten ist, daß allerdings die jeweiligen "Normalwerte" durch

parallele Kontrollversuche mit bestimmt werden müssen, da sich mögliche Veränderungen im jeweiligen Tiermaterial, die auch in sehr konstanten Zuchten vorkommen können, sonst nicht erfassen lassen und zu Irrtümern Anlaß geben können. Auf der Grundlage von solchen Messungen gelingt es, Dosis-Wirkungsbeziehungen besser herzustellen als allein anhand von Aplasien. Außerdem weisen diese Befunde darauf hin, daß eine Verkürzung von Skelettelementen auf ein erhöhtes teratogenes Risiko hinweist, da sie kontinuierlich in Aplasien übergehen können.

5. Zusammenfassung

1. An 406 am 21. Tag der intrauterinen Entwicklung durch Sectio gewonnenen und mit KOH-Alizarin aufgehellten und angefärbten Rattenfoeten wurden in über 10.000 Einzelmessungen metrische Angaben über die Größe der mineralisierten Skelettstücke und die Ossifikation gewonnen.

2. An den Tieren wurde der Einfluß von 4,6 und 10 mg Cyclophosphamid/kg/Tag an den Tagen 11 bzw. 12, der Einfluß von 5 bzw. 15 mg Azathioprin/kg/Tag an den Tagen 10-13 bzw. 11-14 der intrauterinen Entwicklung sowie der Einfluß von Kombinationen beider Cytostatika untersucht.

3. Mit 10 mg Cyclophosphamid/kg/Tag wurden Mißbildungen beobachtet, die sich als Fehlen des Schädeldaches, Gaumenspalten, Aplasien und Reduktionen der Extremitätenknochen sowie Veränderungen der Wirbelkörper manifestierten.

4. Die Verwendung von Azathioprin allein führt zu keinen nennenswerten Reduktionen der Skelettmaße und Ossifikation (bestimmt als Zahl der Knochenkerne für Skelettelemente).

5. Bei Verwendung von Substanzkombinationen zeigt sich für niedrige Dosierung beider Substanzen eine hochgradige Verstärkung des Hemmeffektes auf die Skelettentwicklung, während bei höherer Dosierung beider Substanzen das Azathioprin anscheinend zu einer Abschwächung der teratogenen Potenz des Cyclophosphamids führt.

6. Seitenverschiedenheiten der Wirkungen der Einzelsubstanzen oder ihrer Kombinationen wurden nicht gefunden.

7. Beobachtungen und Zahlen werden anhand von Literaturangaben diskutiert, wobei der Wert von Skelettanalysen als einer einfachen und wenig aufwendigen Methode zu Einblicken in das Feingefüge exogener Teratogenesen hervorgehoben wird.

8. Als Ursache der resultierenden Skelettveränderungen muß die Blastemschädigung - morphologisch als Nekrose faßbar - vermutet werden. Zwischen Außmaß der Skelettveränderungen und Zahl der Nekrosen besteht eine Korrelation mit einer Ausnahme: Kombination niedriger Dosen beider Substanzen. Diese Ausnahme kann durch die Hypothese erklärt werden, daß hier der Kompensationsversuch über Erhöhung der Mitoserate unterdrückt wird.

9. Die Bedeutung der Menge und die Verteilung des Blastems für die Mißbildungsentstehung konnte bestätigt werden.

10. Aus den Resultaten ergibt sich, daß Messungen der Knochenlängen das Aufstellen von Dosis-Wirkungskurven erleichtern und Hinweise auf das teratogene Risiko geben.

Literatur

Balinski, B.I.: An introduction to embryology . - W.B. Saunders Co., Philadelphia - London 287-306 (1960)

Burdi, A.: Toluidine blue - alizarin red staining of cartilage and bone in whole-mount skeletons in vitro. - Stain Technol. 40, 45-48 (1965)

Burdi, A.R.; K. Flecker: Differential staining of cartilage and bone in the intact chick embryonic skeleton in vitro. - Stain Technol. 43, 47-48 (1968)

Chalmers, A.H.: Studies on the mechanisms of formation of 5-mercapto-6-methyl-4-riboimidazole, a metabolite of the immunosuppressive drug azathioprine. - Biochem. Pharmacol. 23, 1891-1895 (1974)

Fritz, H.; Hess, R.: Ossification of the rat and mouse skeleton in the perinatal period. - Teratology 3, 331-338 (1970)

Gebhardt, D.O.E.: The embryolethal and teratogenic effects of cyclophosphamide on mouse embryos. - Teratology 3, 273-277 (1970)

Gerebtzoff, A.; Lambert, P.H.; Miescher, P.A.: Immunosuppressive agents. - Ann. Rev. Pharmacol. 126, 287-316 (1972)

Grünberg, H.: The pathology of development. - Blackwell scientific publications. Oxford (1963)

Hackenberger, I.; v. Kreybig, T.: Vergleichende teratologische Untersuchungen bei der Maus und der Ratte. - Arzneimittel-Forsch. 15 1456-1460 (1965)

Henneberg, B.: Normentafeln zur Entwicklungsgeschichte der Wirbeltiere. 15. (Erg.-) Heft. - Normentafeln zur Entwicklung der Wanderratte (Rattus norvegicus Erxleben). G.Fischer, Jena 62-64, 73-109 (1937)

Jensh, R.P.; Brent, R.L.: Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S. staining for fetal rat bone. - Stain Technol. 41, 179-183 (1966)

Kaplan, S.R.; Calabresi, P.I.: Immunosuppressive agents. - New England J. Med. 289, 952-955, 1234-1236, (1973)

Kloppenburg, W.: Wirkung einer Kombination von Cyclophosphamid mit Actinomycin D auf Rattenembryonen. - Med. Dissertation, Freie Universität Berlin (1972)

Kochs, W.: Embryologische Wirkung von Cyclophosphamid in Kombination mit Azathioprin. - Med. Dissertation, Freie Universität Berlin (1972)

Köhler, E.; Merker, H.J.: Effect of cyclophosphamide pretreatment of pregnant animals on the activity of nuclear DNA-dependent RNA-polymerases in different part of rat embryos. - Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 71-88 (1973)

Kreybig, Th. v.: Experimentelle Praenatal-Toxikologie. - Editio Cantor, Aulendorf/Württ. 136-137, 149 (1968)

Kreybig, Th.v.; Schmidt, W.: Chemisch induzierte Fetopathien bei der Ratte. Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Cyclophosphamid und N-Methyl-N-nitroso-Harnstoff nach der Gabe am 15. oder 16. Tag der Gestation. - Arzneimittel-Forsch. 17, 1093-1100 (1967)

Merker, H.J.; Köhler, E.; Neuber, T. und Spors, S.: Elektronenmikroskopische Untersuchung über den Einfluß von Cyclophosphamid auf die Hirnentwicklung der Ratte. - Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. exper. Path. 260, 176 (1968)

Merker, H.J.; Franke, L., Günther, Th.: The effect of D-penicillamine on the skeletal development of rat foetuses. - Naunyn-Schmiedeberg's Archiv exp. Pharmacol. 287, 359-376 (1975)

Merker, H.J.; Mewes, P.; Pospisil, M.: Cytotoxic effect of 6-mercaptopurine on the blastemal cells in limb buds of rat embryos. - Teratology (1975a) in press

Merker, H.J.; Fröhlich, D.; Schumacher, B.: Causes and meaning of shortening of the alizarin-red positiv skeletal elements for teratogenesis and teratogenic risk. - in preparation (1975b)

Merker, H.J.: The problem of critical period (s) in limb bud development. - Titisee-Symposium (Hrsg. W. Lenz, Proceedings (1975) im Druck

Merker, H.J; Schumacher, B. und Fröhlich, D.: Die Bedeutung der Knochenlängen zur Erfassung des teratogenen Risikos. - In Vorbereitung (1975)

Neubert, D.: Beeinflussung des Nukleinsäure- und Protein-Stoffwechsels durch Pharmaka. - Internist, 7, 435-454 (1966)

Neubert, D.; Merker, H.J.; Köhler, E.; Krowke, R.; Barrach, H.J.: Biochemical aspects of teratology. - Adv. Biochemical aspects of teratology. - Adv. Biocciences 6, 575-622 (1970)

Scheiffarth, F.; Warnatz, H.: Langzeitbehandlung von Immunopathien unter besonderer Berücksichtigung immunosuppressiver Medikamente. - Dtsch. med. Wschr. 94, 2444-2449 (1969)

Scheiffarth, P.: Immunsuppressiva.Vortrag 24. Nürnberger Fortbildungskongreß d. Bayr. Landesärztkammer, Nürnberg, (8.12. 1973)

Schmidt, W.: Mikroskopische Untersuchungen an experimentell erzeugten Mißbildungen der Ratte. - Anatom. Anzeiger 120, 9-13, (1967)

Schweichel, J.U. and Merker, H.J.: The morphology of various types of celldeath in prenatal tissues. - Teratology, 7, 253-266 (1973)

Short, R.D.; Gibson, J.E.: ^{14}C-Cyclophosphamide alkylation of mouse embryo macromolecules.- Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 145, 620-624 (1974)

Singh, S.; Sanygal, A.K.: Abnormal patterns of ossification in the hands of foetuses produced by cyclophosphamide administration to pregnant rats. - Acta anat. 89, 121-133 (1974)

dies.: Skeletal malformations of forelimbs of rat fetuses caused by maternal administration of cyclophosphamide during pregnancy. - J. Anat. 117, 179-189 (1974)

Siegert, O.: Medizinische Dissertation, Freie Universität Berlin (in Vorbereitung)

Strong, R.M.: The order, time and rate of ossification of the albino rat (Mus norvesgicus albinus) skeleton. - Amer. J. Anat. 36 , 313-356 (1925)

Tidd, D.M.; Paterson, A.R.P.: Distinction between inhibition of purine nucleotide synthesis and the delayed cytotoxic reaction of 6-mercaptopurine. - Cancer Res. 34, 733-737 (1974)

dies.: A biochemical mechanism for the delayed cytotoxic reaction of 6-Mercaptopurine. - Cancer Res. 34, 738-746 (1974)

Tuchmann- Duplessis, H.: Teratogenic drug screening. Present procedures and requirements. - Teratology 5 271-286 (1972)

Tuchmann-Duplessis, H.: The action of anti-tumor drugs on gestation and on embryogenesis. - Teratology. Proc. of a Symposium, organized by the Italian Soc. of Exper. Teratology, Como, Italy (1967) (eds. Bertelli, A. and L. Donati) Excerpta Medica Found., Amsterdam 75-86 (1969)

Tuchmann-Duplessis, H.; Mercier-Parot, L.: Dissociation des proprietes antitumorales et teratogenes d'un antimetabolite des purines, l'azathioprine. C.R. Biol. 159, 2290 (1965)

Williams, J.R.; Little, J.B. and Shipley, W.V.: Association of mammalian cell death with a specific endonucleolytic degradation of DNA.- Nature 252, 754-755 (1975)

Wilson, J.: Teratogenic interaction of chemicalagents in the rat. - J. Pharm. exp. Ther. 144 429 (1964)

Wilson, J.G.: Use of rhesus monkeys in teratological studies. - Feder. Proc. 30, 104-109 (1971)

Wilson, J.G.: Present status of drugs as teratogens in man. - Teratology 7, 3-16 (1973)

Wright, H.V.; Asling, C.W., Dougherty, H.L.; Nelson, M.M.; Evans, H.M.: Prenatal development of the skeletons of Long-Evans rats. - Anat. Record 130, 659-669 (1958)

7. Anhang

Abbildungen 4 - 15

(Abbildungen 1 - 3 im Text)

Abb. 4 Semidickschnitte, Fixierung nach Karnofsky, Mikropaleinbettung, Färbung nach Giemsa.

A. Rattenembryo Tag 12 p.c. (vordere Extremität) Extremitätenknospen mit blastemartigem Gewebe ausgefüllt.

B. Rattenembryo, früher Tag 13 p.c. 24 Std. nach der zweiten Injektion von Azathioprin. Keine Anzeichen einer Schädigung.

C. Rattenembryo Tag 12 p.c. Hintere Extremität, 24 Std. nach Injektion von 6mg/kg Cyclophosphamid. Einzelne kleine Granula (N) über das Blastem der Extremitätenknospen verstreut (Zellnekrosen).

D Rattenembryo Tag 13 p.c. 24 Std. nach Gabe von 10mg/kg Cyclophosphamid, Querschnitt durch die Spitze der Handplatte mit zahlreichen Nekrosen.

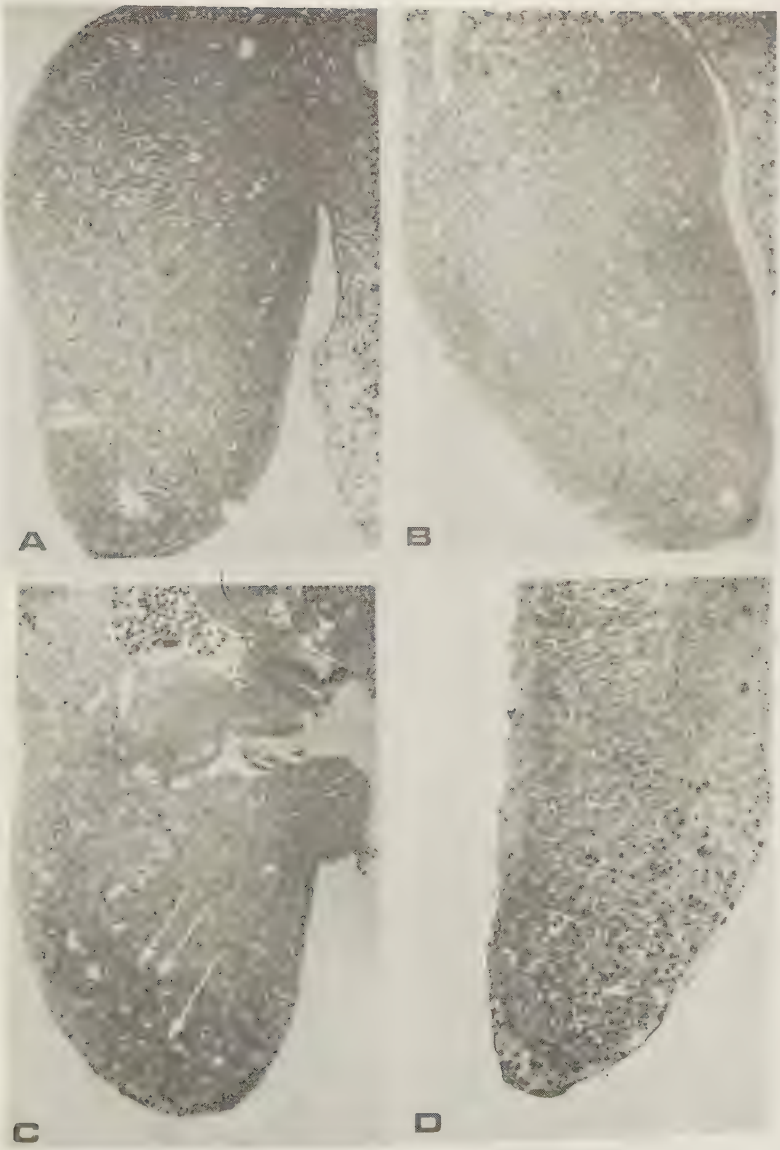

A
B
C
D

Abb. 5 Semidickschnitte (vgl. Abb.1)

A. Höhere Vergrößerung aus 1D (10mg/kg Cyclophosphamidgruppe). Zahlreiche dichte Zelltrümmer im Extrazellularraum.

B. Rattenembryo Tag 13
24 Std. nach Gabe von 4 mg/kg Cyclophosphamid und 2 x 5 mg/kg Azathioprin. Deutliche Nekrosen im Blastem der vorderen Extremität (N).

C. Rattenembryo Tag 14. Nach drei Gaben von 15 mg/kg Azathioprin. Im Bildbereich keine Nekrosen.

D. Rattenembryo Tag 12. Ohne Behandlung. Höhere Vergrößerung aus Abb. 1 A.

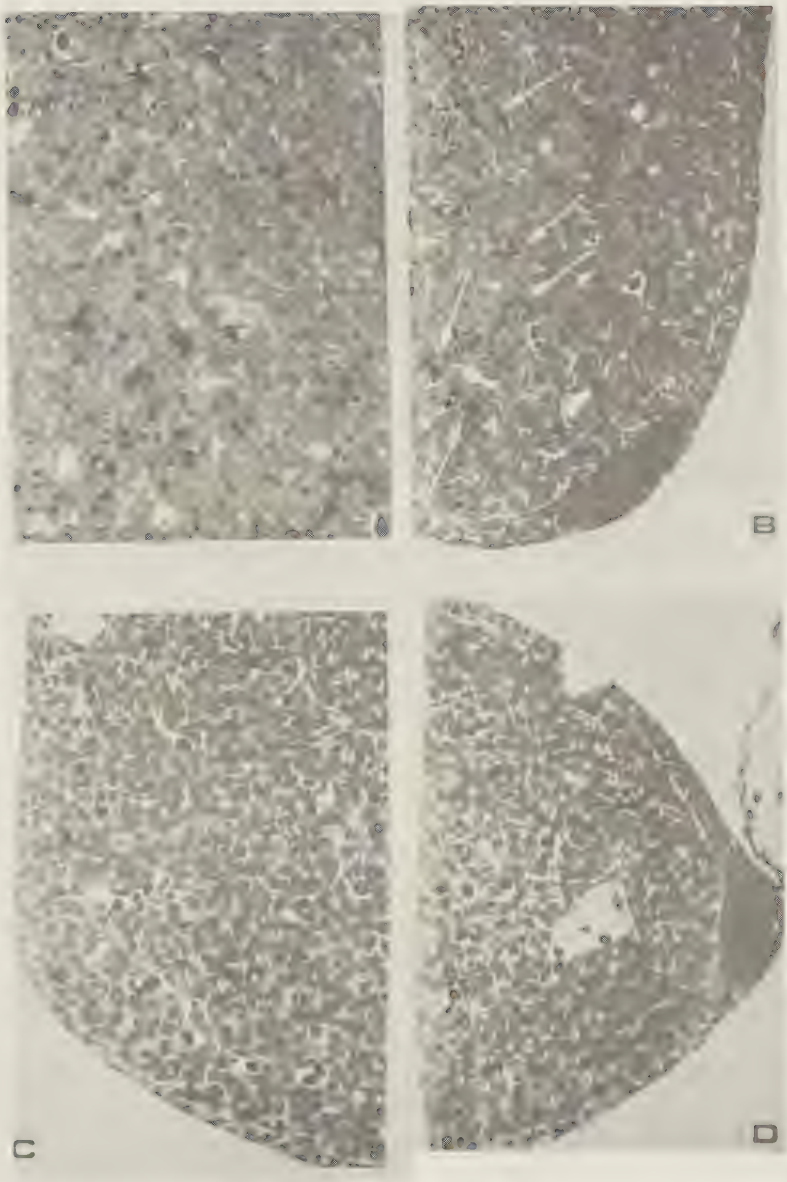

A
B
C
D

Abb. 6

A. Rattenembryo Tag 13 p.c. 24 Std. nach Gabe von 1 x 6 mg/kg Cyclophosphamid und 3 x 5 mg/kg Azathioprin. Bereich mit vielen Nekrosen (N).

B. Rattenembryo Tag 13. 24 Std. nach Gabe von 10 mg/kg Cyclophosphamid. Höhere Vergrößerung eines Nekrose-Bereiches, zahlreiche Zelltrümmer und geschwollene Zellen.

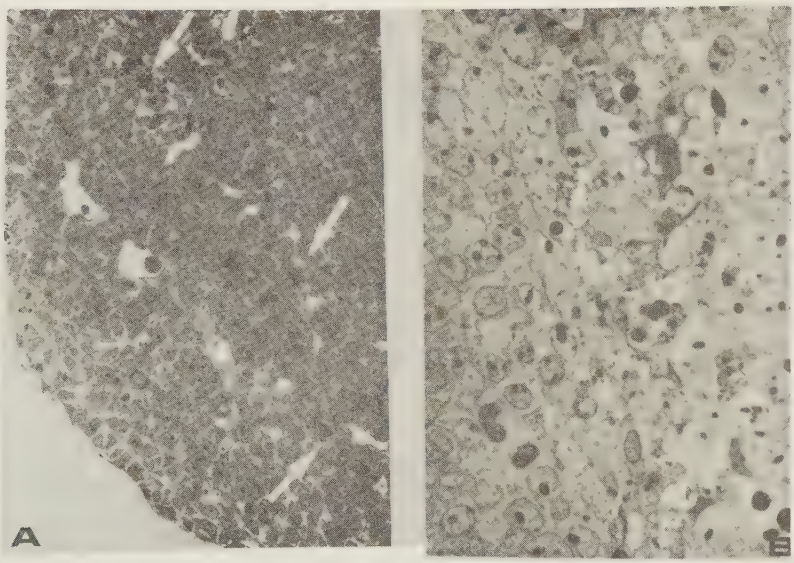

A
B

Abb. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme Rattenembryo Tag 12 p.c. Blastem der vorderen Extremität. Blastemzellen mit großen Nuclei (N), im Zytoplasma viele freie Ribosomen (O)
Einzelne Hohlräume des endoplasmatischen Retikulums (X) kleine interzelluläre Räume (I)
Vergrößerung 1 : 8 100

I
I
I
I
N
N
N
MON

Abb. 8 Elektronenmikroskopische Aufnahme. Rattenembryo früher Tag 13. 12 Std. nach der 2. Injektion von je 15mg/kg Azathioprin. Blastem der oberen Extremität. Mit typischen Zellen, die Differenzierungs-Zeichen aufweisen: Rauhes endoplasmatisches Retikulum ( ). Sonst keine Schädigungsmerkmale.
Vergrößerung: 1 : 8 400

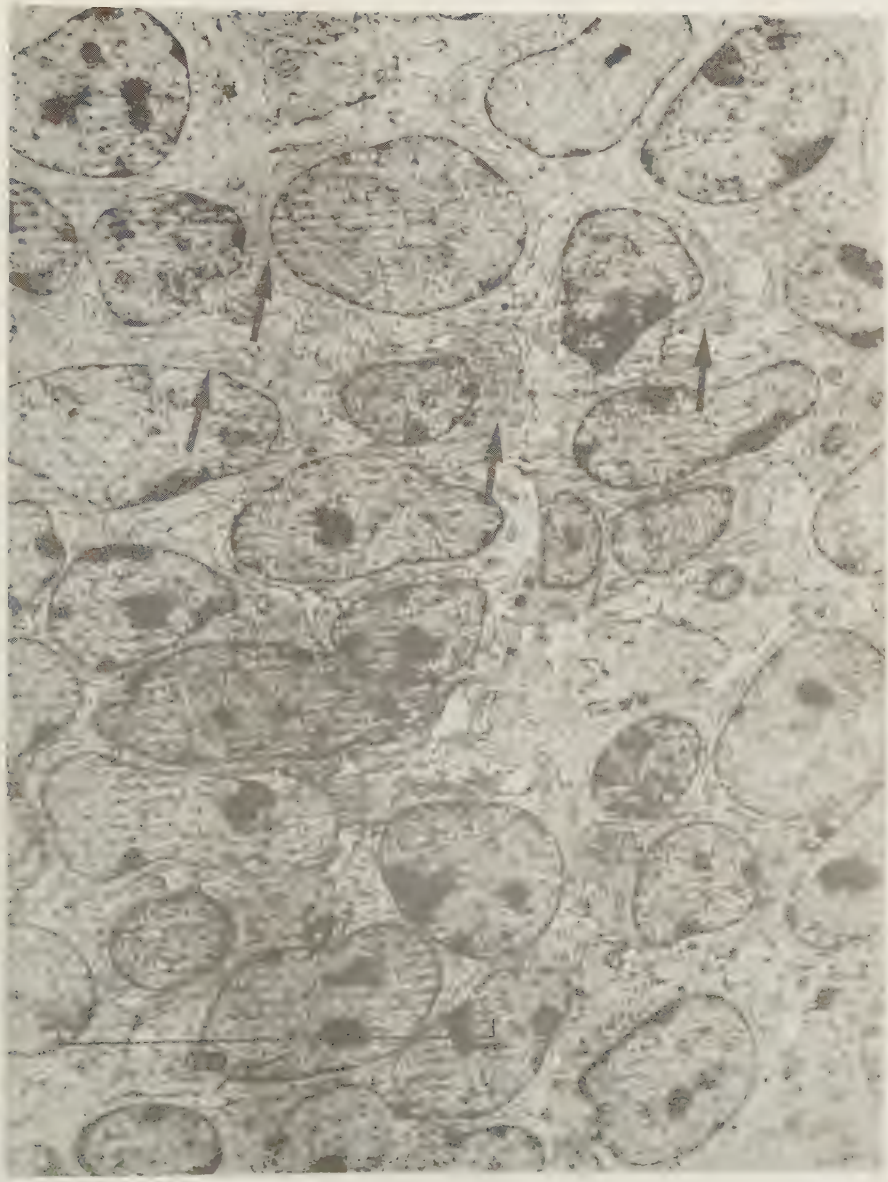


Abb. 9 Elektronenmikroskopische Aufnahme. Rattenembryo Tag 13. Blastem der oberen Extremitäten, 24 Std. nach Gabe von 10mg/kg Cyclophosphamid. Im Blastem zahlreiche intra- und extrazelluläre Zelltrümmer, die bei dieser Vergrößerung noch nicht genau zu lokalisieren sind. Bei (M) Auftreten einer Mitose.
Vergrößerung: 1 : 2 500

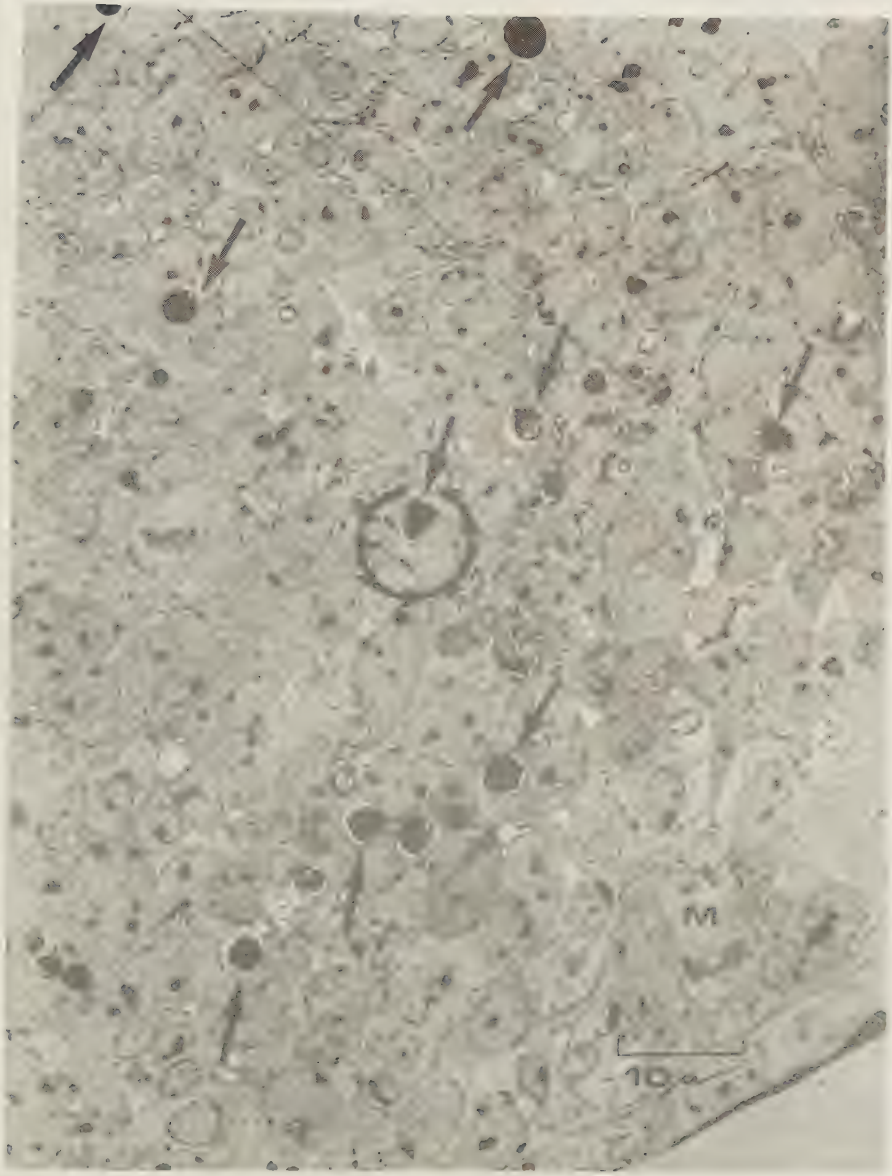

M
10a

Abb. 10 Wie Abb. 6. Höhere Vergrößerung des eingekreisten Bezirkes. Extrazelluläre (I) und intrazelluläre Lage (II) von Zelltrümmern. Die übrigen Zellen sonst unverändert. Vergrößerung: 1 : 14 000

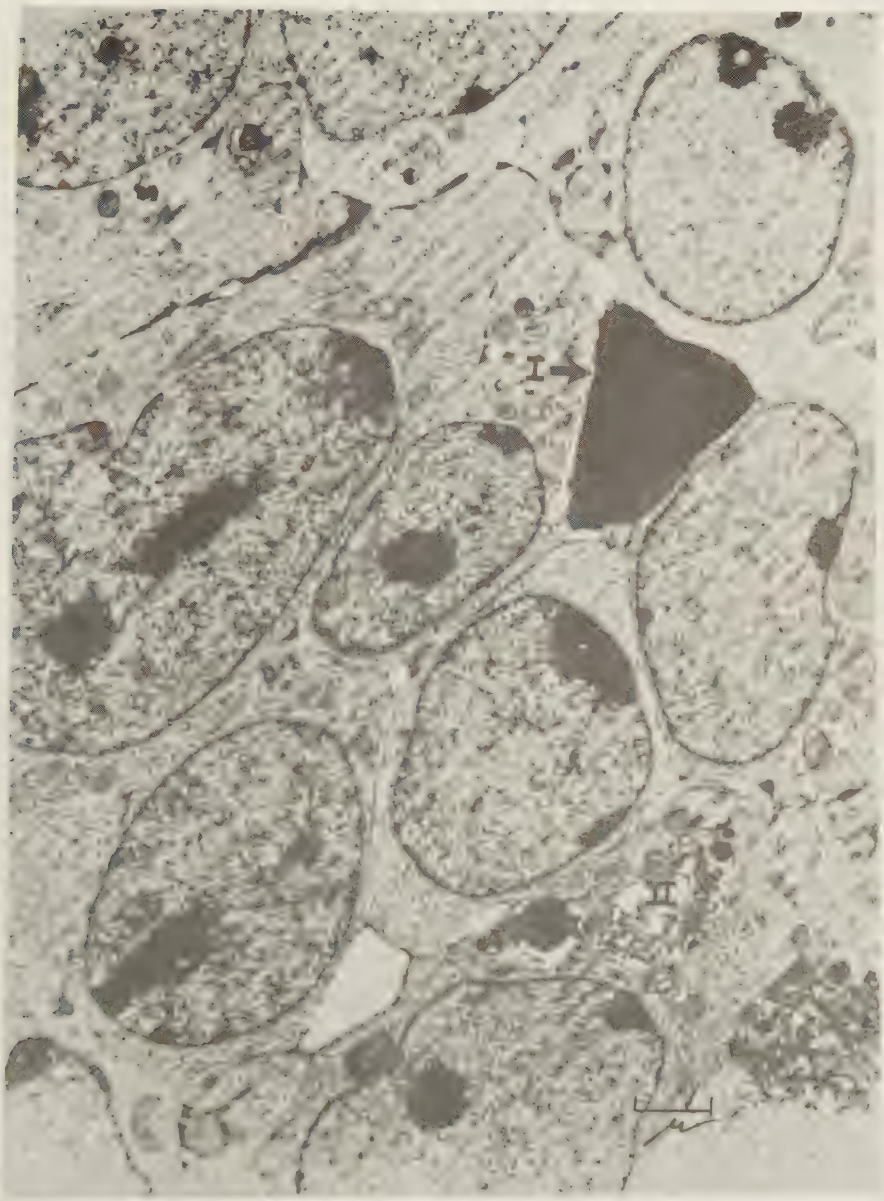

I
II

Abb. 11 Elektronenmikroskopische Aufnahme, Rattenembryo Tag 12 p.c. Blastem der vorderen Extremität. 24 Std. nach Gabe von 4 mg/kg Cyclophosphamid. Beginn einer Zellnekrose (I) mit Verdichtung, Schrumpfung und Einschnürung des Zellkerns. Bei (I x) bereits intrazellulär lokalisierte Zelltrümmer.
Vergrößerung: 1 : 10 500

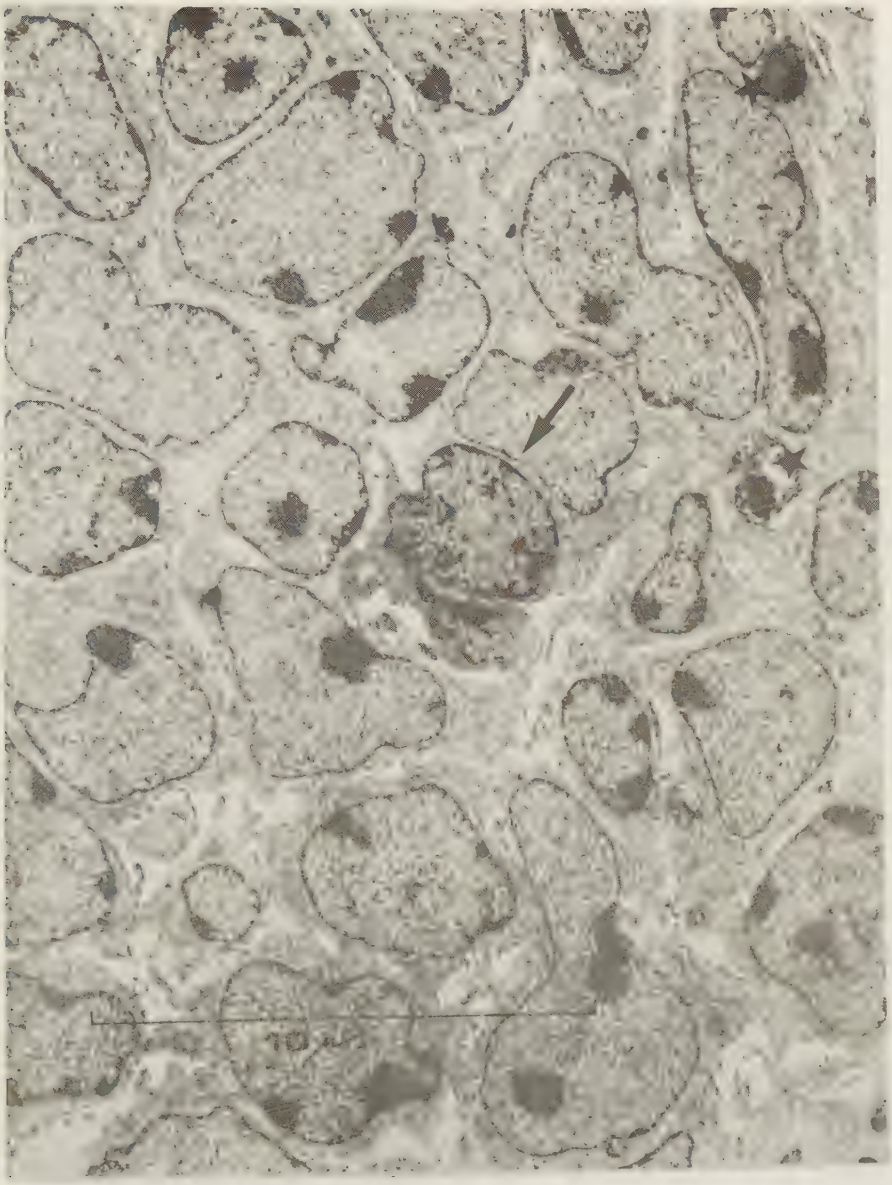


Abb. 12 Elektronenmikroskopische Aufnahme. Rattenembryo Tag 13. 24 Std. nach Gabe von 10 mg/kg Cyclophosphamid. Mit zahlreichen Zelltrümmern im Extrazellulärraum (II) des aufgelockerten Blastems. An einigen Stellen (*) kann eine beginnende Phagocytose vermutet werden. Vergrößerung: 1 : 14 000

Abb. 13 Wie Abb. 9. Höhere Vergrößerung.
Blastemzelle während der Phagozytose.
Extrazelluläres Material (x) und zwei
Fortsätze (F) bei der Umfließung.
Vergrößerung: 1 : 56 000

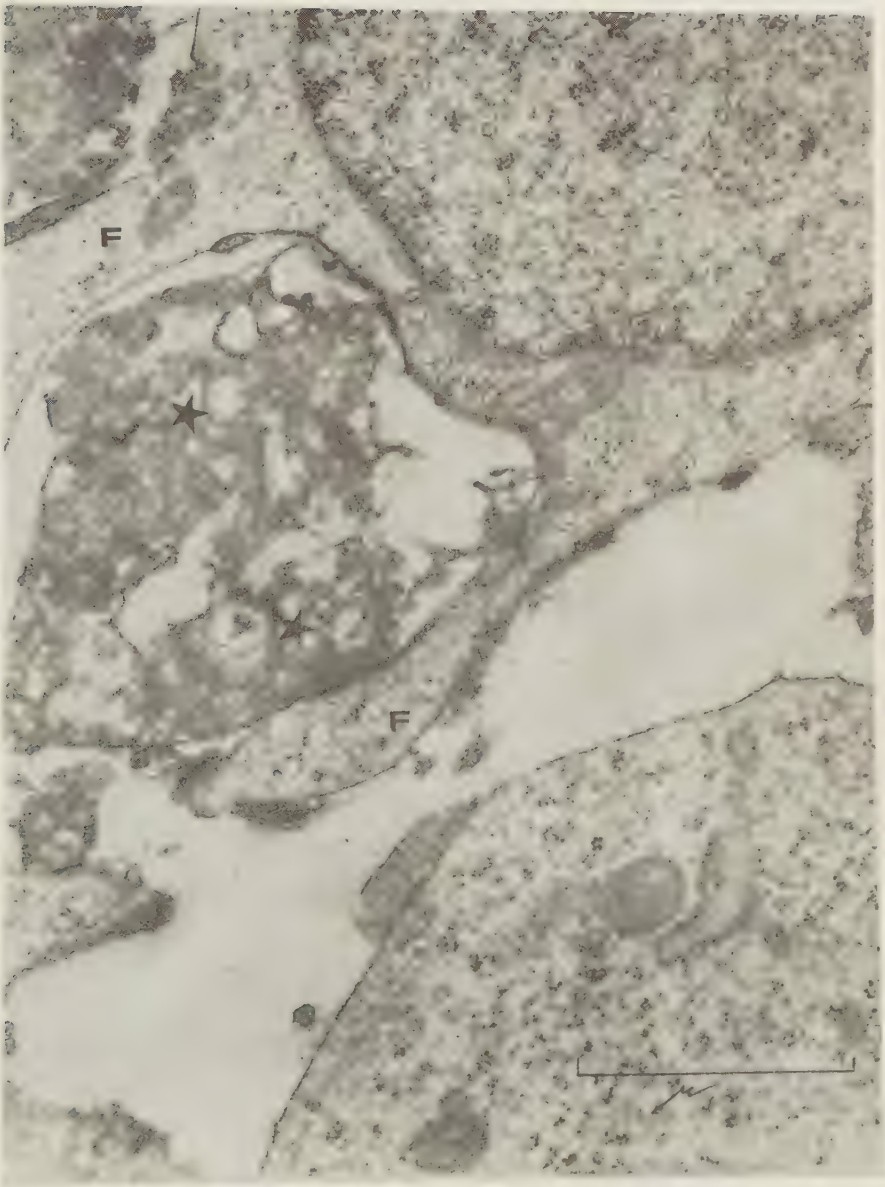

F
F

Abb. 14 Wie Abb. 9. Zelltrümmer im extrazellulären Raum (I) und bereits phagozytiert (II). Blastemzelle mit Zeichen der Differenzierung, z.B. Auftreten von rauhem endoplasmatischem Retikulum (ER).
Vergrößerung: 1 : 35 000

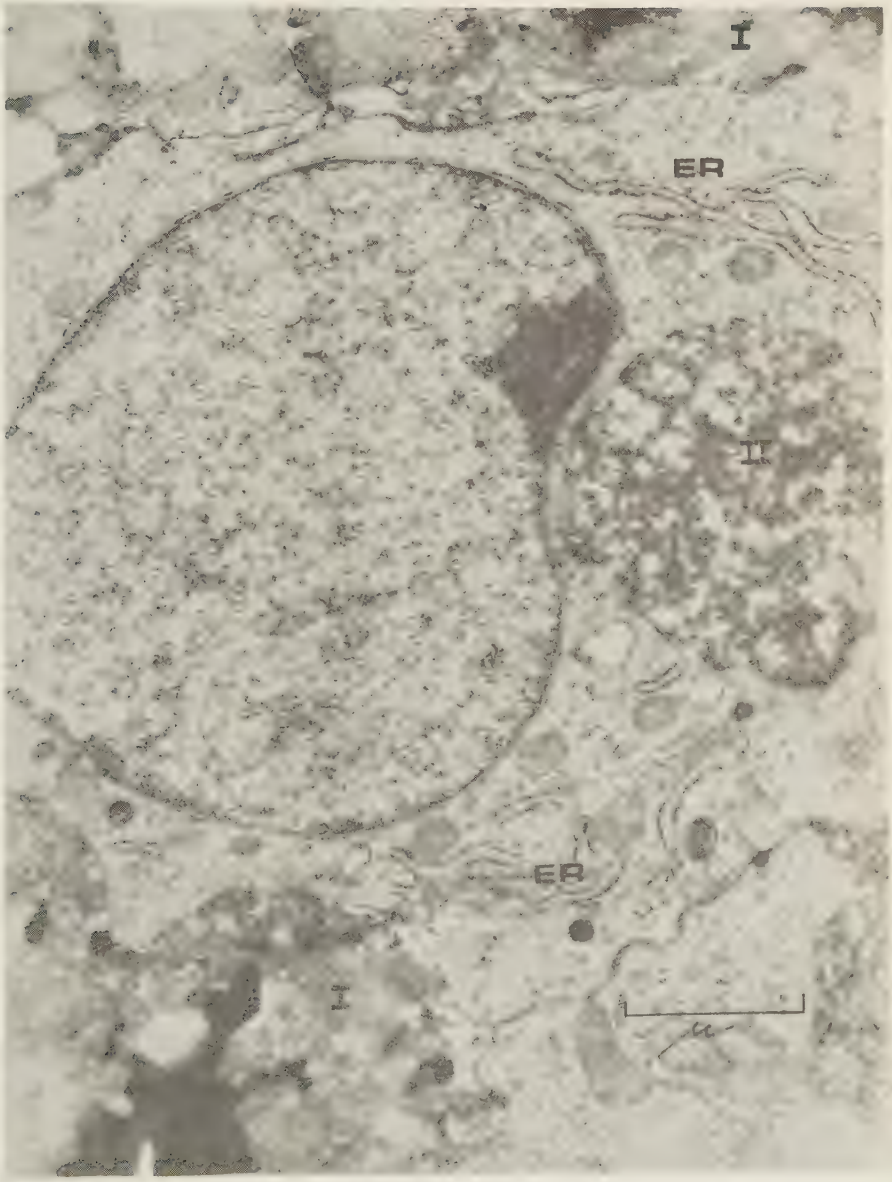
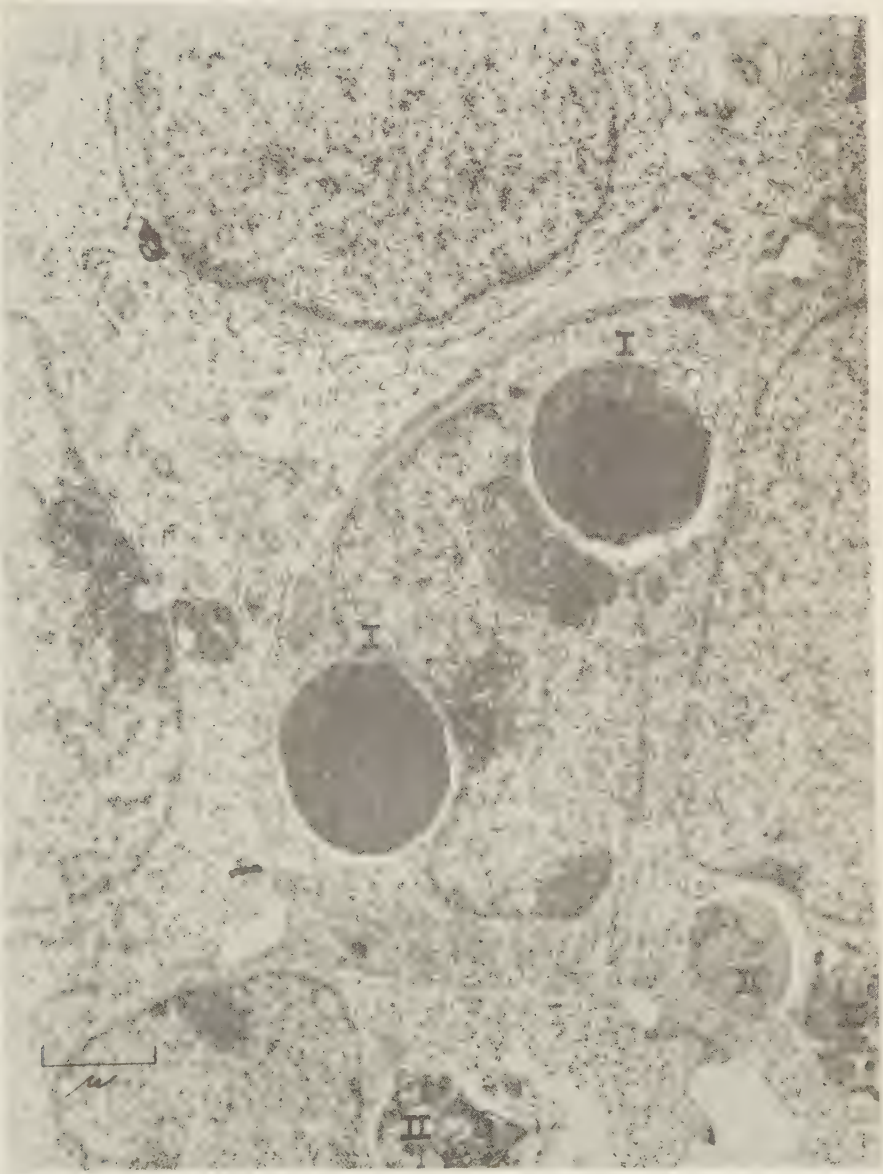

I
ER
II
ER
I

Abb. 15 Wie Abb. 9 Intrazelluläre Lokalisation von Kernfragmenten (I) und anderen Zelltrümmern (II).
Vergrößerung: 1 : 21 000


I
I
II
II

L e b e n s l a u f

Am 2. April 1938 wurde ich, Asisulah Asisi, als Sohn des Ministers Abdul Asis Asisi und seiner Ehefrau Alia Asisi in Kabul/Afghanistan geboren. Ab dem sechsten Lebensjahr besuchte ich für dreizehn Jahre die Nedjat-Oberrealschule in Kabul, wo ich 1956 das Abitur mit Erfolg bestand. Danach studierte ich zwölf Semester Medizin an der Universität Kabul. Nach Absolvierung meines Staatsexamens im Jahre 1962 arbeitete ich für ein Jahr als Medizinalassistent an der Universitäts-Klinik in Kabul. Von 1964 bis Februar 1967 war ich als Chirurg in der Universitäts-Klinik Kabul und als Assistent am Anatomischen Institut Kabul tätig. Von Februar 1967 bis August 1968 wurde mir ein Stipendium vom Senat Berlin genehmigt. Während dieser Zeit übte ich die Tätigkeit als Chirurg am Neuköllner Krankenhaus und als Anatom an der F.U.Berlin aus. Im August 1968 kehrte ich in meine Heimat nach Kabul zurück. Hier nahm ich meinen früheren Arbeitsplatz wieder ein.

Seit November 1970 arbeite ich als wissenschaftlicher Assistent am Anatomischen Institut der F.U.Berlin, wo ich unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J.Merker die vorliegende Dissertation anfertigte.
1965 heiratete ich Aeisha, 1966 wurde meine Tochter Maria, 1967 mein Sohn Said und 1969 meine Tochter Mejgan geborgen.

B. Ladewig - Dissertationsdruck - 1 Berlin 12 - Pestalozzistraße 106
Tel.: 3128885 - 3138198